



Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

**Contribución al estudio de la muerte celular programada en
Echinococcus granulosus: clonado y expresión del gen *caspasa-3*.**

María Varela.

Tutora: Dra. Cora Chalar.

Sección Bioquímica - Biología Molecular.

Facultad de ciencias, Udelar.

Noviembre, 2016

[AGRADECIMIENTOS]

A la Dra. Cora Chalar por brindarme la posibilidad de realizar esta pasantía, por su tiempo, su optimismo y diligencia durante todo el proyecto,

Al laboratorio 304, en especial a Mariana, Cecilia, Gabriela, Ximena y Adriana, lograron que este trabajo fuera mi continuo aprendizaje,

A la Sección Bioquímica - Biología Molecular, porque de una u otra forma todos me ayudaron,

A mis amigos joaco, lau, marti, iva y la petti, sin ellos no hubiese llegado hasta aquí,

A mis padres, por su apoyo durante todo este tiempo,

Gracias!!

[ABREVIATURAS]

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

E. coli: *Escherichia coli*

E. granulosus: *Echinococcus granulosus*

CC: corpúsculo calcáreo

Caspasa3Eg: proteína recombinante de *Echinococcus granulosus* caspasa 3

PCR: Polymerase chain reaction - reacción en cadena de la polimerasa

ON: overnight - toda la noche

MPM: marcador de peso molecular

WB: Western blot

SDS PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

IMAC: immobilized metal affinity chromatography - cromatografía de afinidad por metales inmovilizados.

IP: Instituto Pasteur de Montevideo

PDB: Protein Data Bank - (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

NCBI: National Center for Biotechnology Information - (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

RESUMEN

La muerte celular programada es un fenómeno evolutivamente conservado y crucial para funciones vitales tales como la morfogénesis, la homeostasis y la defensa contra patógenos. Si bien las primeras descripciones de la muerte celular programada se realizaron mediante observaciones al microscopio óptico, a medida que se avanzó en la comprensión de sus mecanismos específicos se generaron nuevos métodos para su estudio que hicieron posible describir a nivel molecular el proceso apoptótico de una célula.

Aunque las señales para la ejecución de la muerte celular pueden provenir de diferentes estímulos, los eventos apoptóticos se presentan muy similares debido a que desencadenan vías de señalización intracelular que convergen en la activación de una misma familia de proteasas: las caspasas. Estas son cisteín proteasas específicas de aspartato que una vez activadas, desarrollan una cascada proteolítica que tiene como resultado la desaparición de la célula. La familia de caspasas suele dividirse, en base a la similitud de sus dominios y a la actividad propia de cada enzima, en un grupo proinflamatorio, un grupo iniciador de la apoptosis y un grupo efector de la apoptosis, donde se incluye la principal ejecutora del proceso: caspasa 3. Su activación conduce a la condensación y fragmentación del núcleo, la ruptura del ADN cromosómico, la desorganización del citoesqueleto, y la expresión de señales de fagocitosis que conducirán a que se eliminen los restos celulares empaquetados en cuerpos apoptóticos.

Con el objetivo de contribuir a la comprensión del mecanismo de muerte celular programada en cestodos, se propuso clonar y caracterizar la expresión del gen que codifica para caspasa 3 de *Echinococcus granulosus*. Al igual que otros cestodos, este presenta en su forma larvaria infectiva formaciones calcáreas características, cuyo desarrollo se da por un proceso de mineralización intracelular donde la célula responsable desaparece previa presentación de signos apoptóticos. En este marco, resulta de interés profundizar en el conocimiento del mecanismo apoptótico que se da en el parásito y que está implicado particularmente, en el desarrollo de una estructura que es específica del mismo.

ÍNDICE

1) Introducción	7
1.1) El proceso apoptótico.....	7
1.2) Las caspasas.....	9
1.3) Vías que conducen al desarrollo de la apoptosis.....	12
1.4) Una vez activada caspasa3.....	16
1.5) <i>Echinococcus granulosus</i> como modelo de estudio.....	19
1.6) Hipótesis de investigación.....	20
1.7) Objetivos generales.....	20
1.8) Objetivos específicos.....	20
1.9) Estrategia experimental.....	20
2) Materiales y métodos.....	21
2.1) Obtención del ADNc que codifica para caspasa3Eg.....	21
2.1.1) Extracción de ARNEg total.....	21
2.1.2) Cuantificación del ARNEg.....	22
2.1.3) Evaluación del ARNEg.....	22
2.1.4) Tratamiento con DNasa.....	22
2.1.5) Reacción de retrotranscripción.....	22
2.1.6) Evaluación del ADNc.....	23
2.1.7) Diseño de cebadores para caspasa3Eg.....	23
2.1.8) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
2.2) Clonado de caspasa3Eg.....	25
2.2.1) Ligación a pGEM T Easy Vector.....	25
2.2.2) Transformación en DH5 α de <i>E. coli</i>	26
2.2.3) Selección de las colonias transformantes.....	26
2.2.4) Análisis del ADN plasmídico.....	26
2.2.5) Identificación de caspasa3Eg.....	26
2.2.6) Análisis bioinformático de secuencia.....	27
2.3) Modelado molecular de caspasa3Eg.....	28
2.4) De vector de clonado a vector de expresión.....	28
2.4.1) Preparación del vector de expresión.....	30
2.4.2) Tratamiento del ADN caspasa3Eg.....	30

2.4.3) Subclonado del amplicón.....	31
2.4.4) Preparación del inserto.....	31
2.4.5) Ligación.....	32
2.4.6) Transformación de células Dh5α de <i>E. coli</i>	32
2.4.7) Análisis de los clones.....	32
2.5) Inducción de la expresión de caspasa3Eg.....	32
2.5.1) Ensayo en cepa BL21(DE3)pLysS <i>E. coli</i>	32
2.5.1a) Inducción en medio LB.....	33
2.5.1b) Inducción en medio ZYM.....	34
2.5.1c) Inducción en medio ZYM a 20°C.....	35
2.5.2) Western blot.....	35
2.5.3) Análisis del uso de codones.....	35
2.5.4) Ensayo en cepa Rosetta de <i>E. coli</i>	36
2.5.5) Procesamiento de las muestras.....	36
2.6) Purificación de caspasa3Eg.....	37
2.6.1) Cromatografía de afinidad.....	37
2.6.2) Análisis por espectrometría de masa.....	38
2.6.3) Cromatografía de intercambio iónico.....	38
3) Resultados.....	39
3.1) Obtención del ADNc que codifica para caspasa3Eg.....	39
3.2) Clonado de caspasa3Eg en pGEM T Easy vector (Promega).....	41
3.3) Modelado molecular de caspasa3Eg.....	44
3.4) De vector de clonado a vector de expresión.....	47
3.5) Inducción de la expresión de caspasa3Eg.....	52
3.6) Purificación de caspasa3Eg.....	53
4) Discusión de resultados.....	56
5) Conclusión y perspectivas.....	64
6) Bibliografía.....	66
7) Anexos.....	70
7.1) Protocolos.....	70
7.2) Solución amortiguadoras, soluciones y medios de cultivo.....	75
7.3) Nomenclatura de codones.....	77

1) INTRODUCCIÓN

Los organismos eucariotas multicelulares mantienen su homeostasis a través del balance entre la proliferación y la muerte celular. La progresión del ciclo celular está muy relacionada con la muerte celular programada, y ambos procesos se encuentran bajo un estricto control recíproco que ha sido blanco de investigación intensiva por los mecanismos moleculares que involucra (Fujisi et al., 2000). El término apoptosis tiene su origen en una palabra griega que significa “caerse, desprenderse”, y fue utilizado por primera vez en 1972 por J. F. R. Kerr y sus colegas del Departamento de Patología de la Universidad de Aberdeen para describir el suicidio celular o muerte celular programada (Kerr et al., 1972).

1.1) El proceso apoptótico

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada crucial en procesos biológicos de eucariotas, tales como el desarrollo embrionario, la morfogénesis de órganos y tejidos, el sistema inmune, y el envejecimiento del organismo. El recambio constante de células en tejidos epiteliales o intestinales también dependen principalmente de la apoptosis. Además, la apoptosis puede ocurrir como un mecanismo de defensa cuando las células son afectadas por agentes nocivos o patógenos. El proceso apoptótico esencialmente, permite a los eucariotas eliminar células dañadas, o que resultan sobrantes o mal ubicadas, sin generar distorsión ni lesión en el ámbito que las rodea (Lippens et al., 2009). Es un ejemplo de eliminación de células en exceso, la eliminación apoptótica de las membranas interdigitales en la formación de los dedos en el feto. Mientras que algunos ejemplos de eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo son aquellas células infectadas por virus, aquellas células efectoras del sistema inmune que luego de haber ejercido la respuesta inmune deben de ser eliminadas para prevenir reactividad frente a los constituyentes propios del organismo, y aquellas células con una lesión en su genoma que puedan llegar a desarrollar cáncer, entre otras (Cascales Angosto, 2003).

La apoptosis implica una programación genética de la célula que promueve una serie de cambios morfológicos y bioquímicos coordinados en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación.

Si bien las primeras descripciones de la muerte celular programada se realizaron mediante observaciones al microscopio óptico, a medida que se avanzó en la comprensión de sus mecanismos específicos se generaron nuevos métodos para el estudio de la muerte celular. Sumado al desarrollo del microscopio electrónico, actualmente se encuentran disponibles un conjunto variado de técnicas bioquímicas y celulares que permiten describir una célula cuando está sufriendo un proceso apoptótico. De acuerdo a criterios morfológicos, para que la muerte celular sea catalogada como apoptótica, en ella debe observarse la condensación seguida de fragmentación del núcleo y el empaquetamiento de los restos celulares en vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos rodeados por la membrana celular íntegra. Los cuerpos apoptóticos son reconocidos y removidos por células fagocíticas, de forma que la apoptosis es también notable por la necesidad de células auxiliares y por la ausencia de inflamación alrededor de la célula muerta (Kerr et al., 1972).

Desde un punto de vista fisiológico, una célula apoptótica debe cortar contactos con células vecinas, desorganizar su citoesqueleto, activar endonucleasas que causen la escisión del ADN cromosómico en fragmentos internucleosomales, dismantelar las láminas nucleares provocando la condensación del núcleo, expresar señales de fagocitosis y activar proteínas específicas que preparen la célula para el cese de sus funciones metabólicas (Kerr et al., 1972). Ha sido demostrado que la fagocitosis rápida de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento en la membrana celular de moléculas como la N-acetilglucosamina y de la fosfatidilserina, que son reconocidas por receptores presentes en macrófagos, células dendríticas, leucocitos polimorfonucleares e incluso células endoteliales (Yassin et al., 2006).

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia (como hormonas o factores de crecimiento) y comience a recibir señales de muerte. Dependiendo del origen del estímulo apoptótico, las señales desencadenarán el proceso apoptótico a través de una vía intrínseca, también llamada mitocondrial, o una vía extrínseca que involucra interacciones con ligandos extracelulares (ver sección 1.3). Si bien las señales para la ejecución de la apoptosis pueden provenir de diferentes estímulos, los eventos apoptóticos se presentan muy similares. Esto se explica porque todas las señales convergen en la activación de una misma familia de proteasas, las

caspasas, encargadas de orquestar el proceso dando lugar a los rasgos característicos de la apoptosis (Cascales Angosto, 2003; Stennicke et al., 1997).

1.2) Las caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas que además de conducir el desarrollo de la apoptosis, participan en la activación de citoquinas proinflamatorias, y en la diferenciación de queratinocitos. A la primera caspasa identificada en 1992, caspasa-1, le siguió el descubrimiento de 25 caspasas en eucariotas, 14 de ellas en mamíferos y hasta la fecha, 12 son caspasas humanas (Sivakumar et al., 2016; Kang et al., 2008; Rupinder et al., 2007; Cascales Angosto, 2003). Ellas son cisteín proteasas específicas de aspartato (D), de ahí su nombre: cisteinil-aspartato proteasas. Poseen un sitio de reconocimiento a una secuencia del sustrato diana, y un sitio activo altamente conservado en cuyo centro catalítico se encuentra un pentapéptido de estructura general QACXG, donde X puede ser R, Q o G (ver anexo 3), y en el entorno del mismo, un residuo de histidina que también está implicado en la catálisis (Ventura Gallegos, 1999; Cohen, 1997).

Las caspasas siguen un mecanismo de reacción común a las enzimas que presentan un residuo nucleofílico en su centro catalítico, como son los residuos de cisteína, serina e histidina (Figura 1a). Estos residuos presentan un orbital con un par de electrones responsables de llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico. El rompimiento del enlace peptídico ofrece una gran barrera energética que es salvada por medio de la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol del residuo de cisteína con el grupo carbonilo del enlace peptídico que es hidrolizado. El intermediario covalente se forma con la enzima unida al grupo acilo del péptido ya cortado. Este intermediario es inestable y por tanto, más propenso a reaccionar con un hidroxilo que sirve como aceptor final del grupo acilo, de lo que sería el enlace peptídico sin alteración (Ventura Gallegos, 1999; Figura 1b).

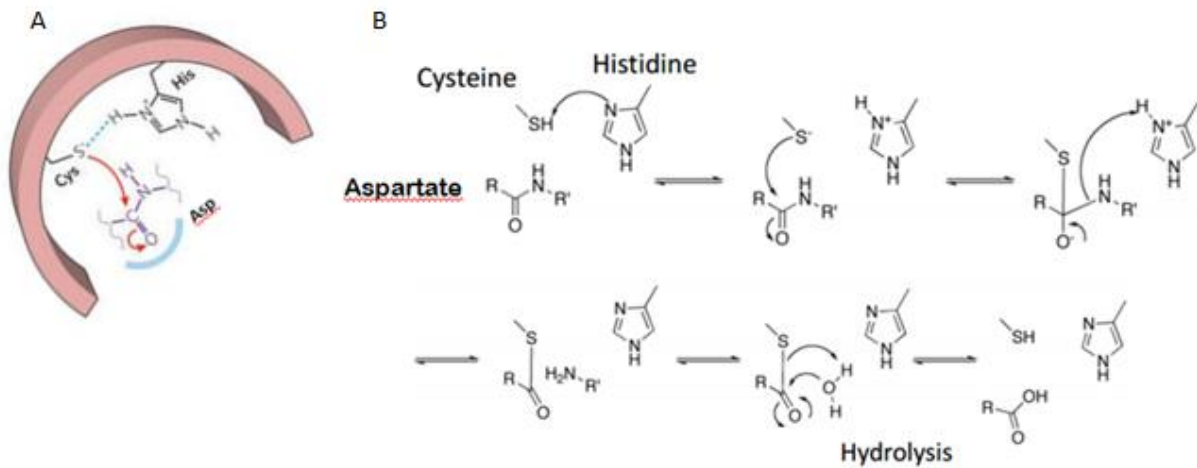


Figura 1. (A) Ilustración del sitio activo de una caspasa mostrando los residuos responsables del ataque nucleofílico. (B) Se esquematiza el mecanismo de la triada catalítica que ocurre en el sitio activo de las caspasas. Modificado de www.flashman.chem.ox.ac.uk.

Basados en la observación de que las caspasas rompen sus sustratos en el residuo D y a su vez son activadas por el procesamiento proteolítico en un residuo D, se ha comprendido que estas proteasas conforman una cascada proteolítica que conlleva su propia activación (Rojas et al., 2009). Se expresan como zimógenos inactivos conocidos como procaspasas, que junto con sus inhibidores, siempre coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Un mismo zimógeno requiere de al menos dos cortes para su maduración. El primer corte elimina un pro-dominio en el extremo amino terminal cuyo tamaño ronda los 10 kDa aunque puede variar según la caspasa implicada. El segundo corte genera dos subunidades: una subunidad grande de aproximadamente 20 kDa que contiene el sitio activo, y una subunidad pequeña de alrededor de 10 kDa, también importante para su actividad enzimática. En algunas caspasas, la unión entre la subunidad grande y la subunidad pequeña es removida mediante dos cortes D-X que eliminan una región de unión (Cohen, 1997; Ventura Gallegos et al., 1999).

En la resolución de la estructura tridimensional de caspasa 1 humana por cristalografía de rayos X se observan dos heterodímeros que se unen para formar un tetrámero, análogo a lo observado en caspasas 3 y 8: las dos subunidades pequeñas (10 kDa en caspasa 1 y 12 kDa

en caspasa 3 y 8) aparecen rodeadas por las dos subunidades grandes (20 kDa en caspasa 1 y 8, y 17 kDa en caspasa 3), que se disponen en dirección opuesta. Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con los residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis. Los dos sitios activos de ambos heterodímeros quedan localizados en extremos opuestos del tetrámero, aunque aún no hay evidencias de que exista cooperatividad o modulación alostérica entre ellos (Cascales Angosto, 2003; Kruidering et al., 2000; Nicholson, 1999; Elliot et al., 2009).

En base a la similitud de la secuencia en los dominios de las subunidades, y a la actividad de la enzima, la familia de caspasas se divide en el grupo inflamatorio, que comprende la caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14; el grupo iniciador de la apoptosis que incluye las caspasas 2, 8, 9 y 10; y el grupo efector de la apoptosis que contiene a las caspasas 3, 6 y 7. Tanto las caspasas inflamatorias como las iniciadoras suelen tener un prodominio largo que contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas, siendo cruciales para su activación y la consiguiente amplificación de la cascada apoptótica (Cascales Angosto, 2003). Algunas procaspasas pueden ser reclutadas directamente por los dominios CARD o pueden requerir proteínas adaptadoras adicionales que permitan la unión a su proteína blanco, como es el caso de la procaspasa-2 (Degterev, 2008; Park, 2007).

En la siguiente imagen se representa la familia de las caspasas de modo de visualizar su clasificación, los dominios principales de cada una y la formación de caspasa3 activa como ejemplo.

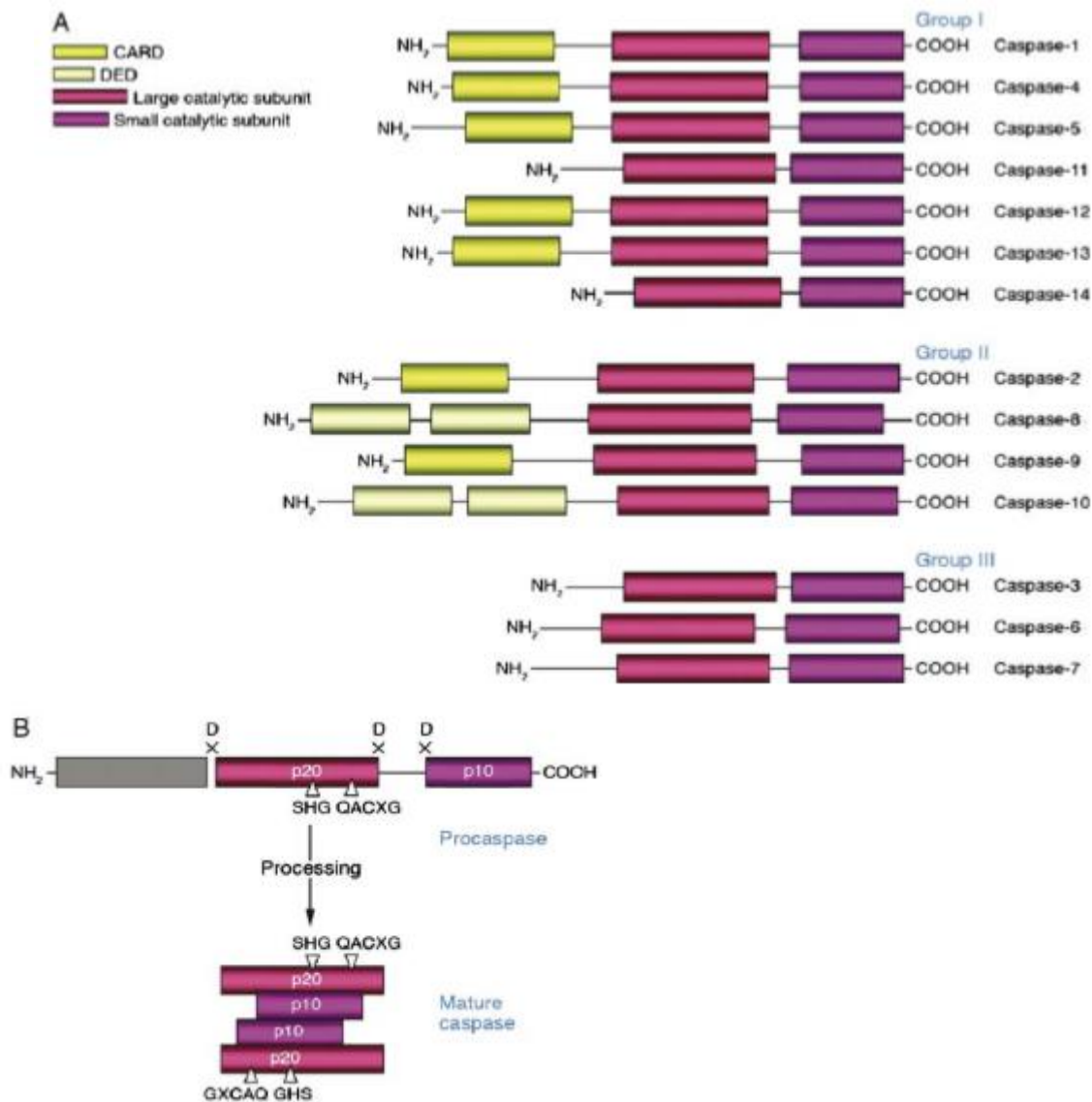


Figura 2. (A) Se esquematizan los tres grupos que conforman la familia de caspasas: grupo 1, caspasas inflamatorias; grupo 2, caspasas iniciadoras; grupo 3, caspasas efectoras. Se pueden identificar en cada grupo los dominios CARD, DED, y las subunidades p10 y p20. (B) Se esquematiza la activación del zimógeno por su clivaje en el residuo D, y la formación de la caspasa madura conformada por p20₂–p10₂. Modificado de Rupinder et al., 2007.

1.3) Vías que conducen al desarrollo de la apoptosis

Las señales que conducen a la apoptosis son muy diversas, entre ellas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula, lesión del ADN (ya sea por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.), o moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico, son las más comunes. Dependiendo del origen del estímulo de muerte celular, la apoptosis puede desarrollarse principalmente a través de dos vías

denominadas extrínseca e intrínseca, que aunque pueden solaparse, la transducción de señales en cada una de ellas presenta diferencias.

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, ejemplo típico es el daño en el ADN. Estas señales convergen en la mitocondria generando una disminución del potencial de membrana que induce la formación de estructuras conocidas como poros de permeabilidad transicional mitocondrial. Como resultado, se genera una permeabilización de la membrana externa que permite la liberación de diversas proteínas desde el espacio intermembranal hacia el citoplasma (Sánchez, 2008). Algunas de estas proteínas son el citocromo c, SMAC: second mitochondria-derived activator of caspases, AIF: factor inductor de apoptosis, entre otras. Quizá la más importante de estas proteínas proapoptóticas sea el citocromo c por su función en la formación del apoptosoma. Este es un complejo que media la activación autocatalítica de la caspasa 9, y esta a su vez, activa a la principal caspasa efectora: caspasa 3. Una vez liberado el citocromo c de la mitocondria, este se une y activa a la proteína Apaf-1: factor activador de la proteasa apoptótica en el citoplasma. Apaf-1 está formada por tres dominios: dominio CARD o de reclutamiento de caspasas, dominio de unión al dATP y dominio Y de oligomerización. En condiciones normales se encuentra en el citosol en forma inerte, pero al unirse a citocromo c y a dATP, Apaf-1 se activa y comienza un proceso de oligomerización que resulta en la formación del apoptosoma. Varias unidades Apaf-1 se unen dejando el dominio CARD en el centro, que es responsable de unir el prodominio N-terminal de la procaspasa-9. La procaspasa-9 sufre una autoproteólisis, volviéndose activa y a su vez, activa a otras caspasas. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una cascada expansiva de actividad proteolítica que conduce al desarrollo de la apoptosis (Rojas et al., 2009; Cascales Angosto, 2003).

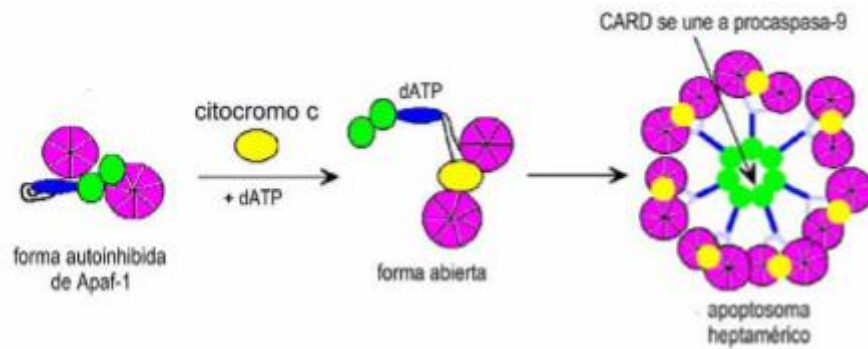


Figura 3. Se esquematiza la formación del apoptosoma como consecuencia de la unión del citocromo c y dATP a la molécula de Apaf-1. Modificada de Cascales Angosto, 2003.

La familia de proteínas Bcl-2 juega un rol importantísimo en la regulación de la vía intrínseca, ya que actúa principalmente a nivel mitocondrial. Algunos miembros de esta familia tienen un tramo de aminoácidos hidrofóbicos cerca de su C-terminal que los ancla en la membrana mitocondrial externa. Otros miembros carecen del dominio de anclaje pero son trasladados a la membrana en respuesta a estímulos específicos. Estos últimos cuando se activan, oligomerizan en la membrana mitocondrial y regulan la permeabilidad de la misma. Las proteínas de esta familia, pueden agruparse según su función en dos grupos principales:

- proteínas pro-apoptóticas: actúan promoviendo la liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma a través de la creación de los poros de permeabilidad transicional o de canales iónicos en la membrana mitocondrial. Son: Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk.
- proteínas anti-apoptóticas: frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c. Son Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1.

No es la cantidad absoluta, sino el balance entre las proteínas pro y anti apoptóticas lo que modula si se va a iniciar o no la apoptosis (Rojas et al., 2009).

Por su parte, la vía extrínseca está mediada por la activación de receptores transmembrana que se da como consecuencia de la unión a sus ligandos. Entre estos receptores, se destacan el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y una proteína relacionada llamada Fas (o CD95). Estos receptores de muerte tienen un dominio intracelular conocido como dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) que reclutan a proteínas adaptadoras. Los ligandos TNFL y FASL son constitutivamente

homotriméricos, la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo compuesto por tres subunidades iguales, que seguidamente recluta factores citosólicos hasta formar un complejo conocido como DISC: complejo de señalización que induce muerte. DISC inicia el ensamblaje y activación de las pro-caspasas iniciadoras, principalmente de la caspasa 8, la cual posteriormente rompe y activa a la caspasa efectora caspasa 3. Se cree que la función de DISC en la activación de caspasa 8 es análoga a la activación de caspasa 9 por el apoptosoma, aunque se desconocen los detalles del mecanismo molecular (Rojas et al., 2009). Caspasa 8 se activa dentro de DISC por dimerización inducida por proximidad (Parrish et al., 2013)

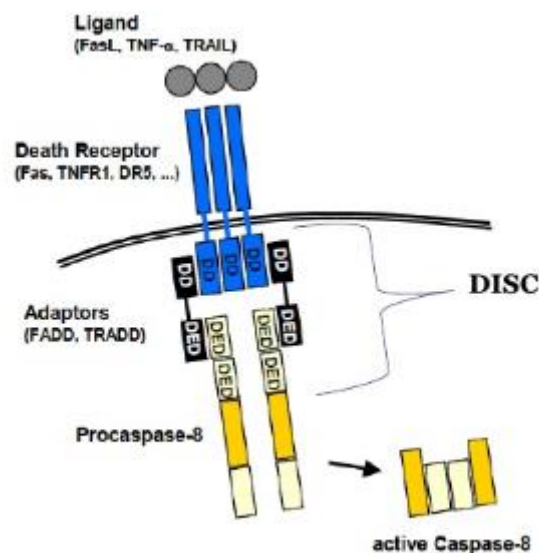


Figura 4. Se esquematiza la formación del complejo DISC como consecuencia de la unión del ligando al receptor de muerte celular y la consecuente activación de caspasa 8. Modificada de Munevar, 2011.

En determinadas células como hepatocitos, Bcl-2 bloquea la muerte celular mediada por Fas, por lo que se requiere una amplificación mitocondrial para provocar la muerte celular. En estos casos, Bcl-2 impide que se genere una degradación suficiente de procaspasa 8 y por tanto no desencadena la activación de caspasas efectoras 3 y 7. La caspasa 8 entonces, media el clivaje de Bid, proteína miembro de la familia Bcl-2, en dos fragmentos, el fragmento C-terminal se localiza en la membrana mitocondrial y provoca la liberación de citocromo c con la consiguiente formación del apoptosoma y desarrollo de la apoptosis

(Breistchopf et al., 2000; Rojas et al., 2009). En la siguiente figura, se puede visualizar esquemáticamente como ambas vías pueden actuar conjuntamente.

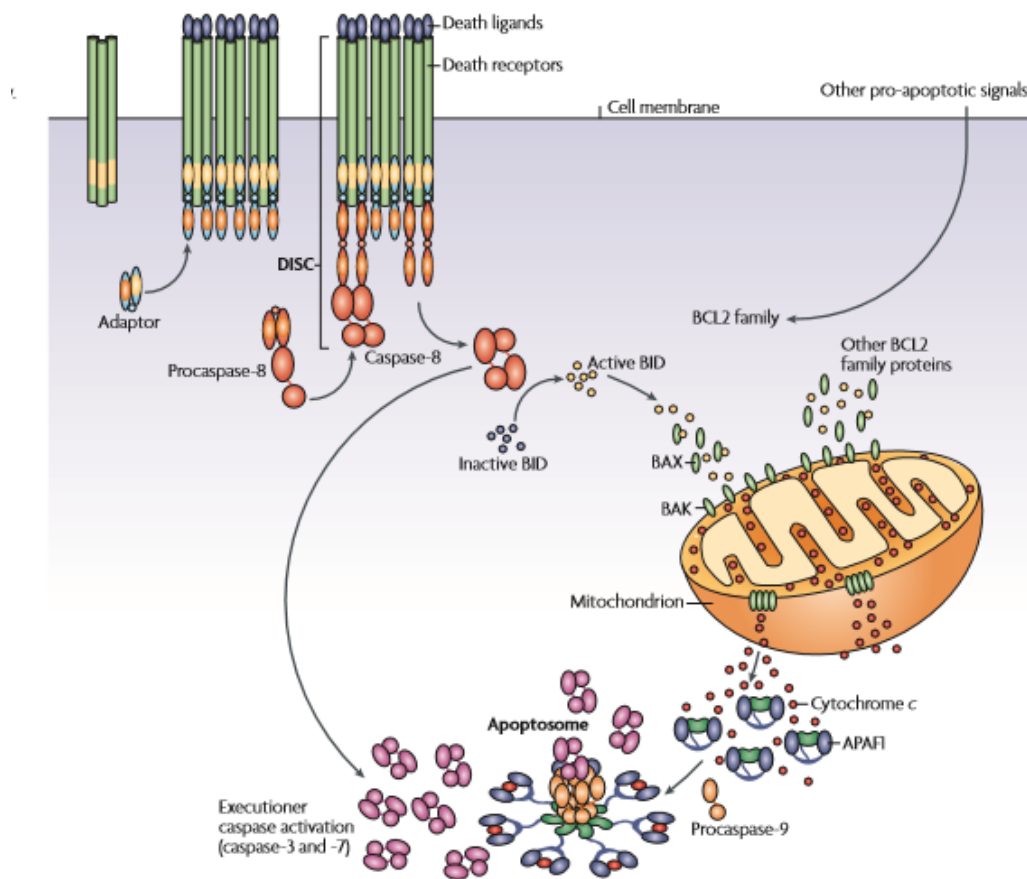


Figura 5. Se esquematiza la activación de BID por caspasa 8 que desencadena la liberación de citocromo c por la mitocondria con la consecuente formación del apoptosoma. Extraída de Ow, 2008.

De cualquier modo, la vía intrínseca y la extrínseca convergen en la activación de caspasa 3, la cual es responsable de las rupturas proteolíticas de un gran número de sustratos durante la apoptosis cuyo común denominador es el sitio de clivaje D-X-X-D. La caspasa 3 junto con las caspasas 6 y 7, son las ejecutoras finales de la apoptosis. Si bien comparten sustratos, y por ende se solapan sus funciones durante la apoptosis, es la caspasa 3 la que aporta características esenciales al proceso (Cohen, 1997; Janicke et al., 1998).

1.4) Una vez activada caspasa 3

El proceso de fragmentación del ADN lo realiza una DNasa activada por caspasa 3 denominada CAD. Cuando CAD se sintetiza, su inhibidor ICAD se une a la cadena naciente de

CAD para permitir su correcto plegamiento. ICAD permanece formando un complejo con CAD, lo cual inhibe su actividad DNasa y enmascara su señal de localización nuclear manteniéndola en el citoplasma. Cuando el estímulo apoptótico activa las caspasas, caspasa-3 rompe la unión ICAD/CAD, y una vez que CAD queda libre puede entrar en el núcleo y actuar como Dnasa, y degradar rápidamente al ADN cromosómico. Dado que la cromatina está envuelta en el octámero de histonas, son las regiones internucleosomales las que quedan expuestas a CAD, separadas cada aproximadamente 200 pb. De aquí surge el patrón característico de bandas en escalera de ADN apoptótico que puede identificarse en una electroforesis en gel de agarosa (Cascales Angosto, 2003; Cohen, 1997).

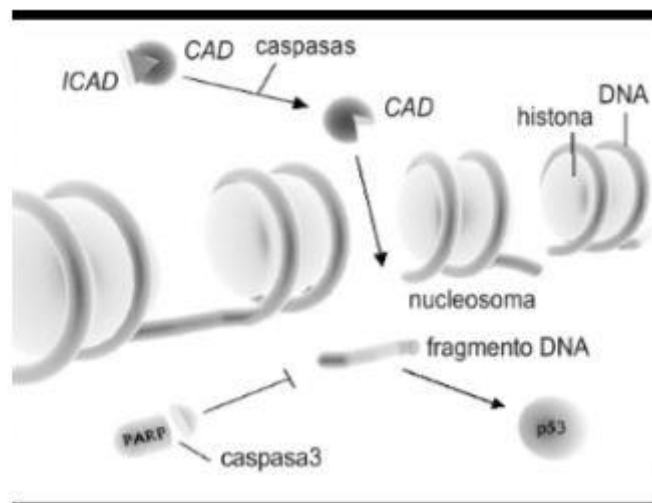


Figura 6. Se esquematiza la ruptura de los nucleosomas por acción de la enzima CAD, consecuencia de la activación de caspasa 3. Modificada de Cascales Angosto, 2003.

La enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) fue la primera proteína identificada como sustrato de las caspasas. PARP es una proteína nuclear implicada en la reparación y estabilidad del ADN, así como en la regulación de su transcripción. Tanto caspasa 3 como caspasa 7 clivan PARP en el sitio DEVD (ver anexo 3), generando una separación de los dedos de zinc que conforman los motivos de unión al ADN. Esto impide que PARP pueda volver a unirse al ADN y efectuar su reparación (Fisher et al., 2002; Los et al., 2002).

Caspasa 3 también realiza la proteólisis de las lamininas A, B y C que forman los filamentos intermedios constituyentes de la envoltura nuclear, provocando la desaparición estructural del núcleo. En el citoplasma, caspasa 3 degrada una proteína implicada en la regulación de

los filamentos de actina llamada gelsolina, que a consecuencia, produce el desensamblaje del citoesqueleto (Cohen, 1997). La forma celular se pierde por la destrucción del citoesqueleto y la célula se vuelve esférica. Las células se retraen, condensan y fragmentan originando los llamados cuerpos apoptóticos, formados de organelos y cromatina rodeadas de membrana plasmática, la cual mantiene su integridad durante todo el proceso (Majno et al., 1995).

La fosfatidilserina es un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. En las células apoptóticas, la fosfatidilserina se expone en la superficie externa de la membrana, pudiendo ser reconocida por los receptores de fosfatidilserina presentes en células fagocíticas, principalmente macrófagos y células dendríticas. Estas células segregan citoquinas que inhiben la inflamación, y de esta manera, los cuerpos apoptóticos son fagocitados dando por finalizado el proceso apoptótico (Cascales Angosto, 2003).

En resumen, pueden describirse tres fases en las que se desarrolla la apoptosis. Una fase efectora, que implica el compromiso irreversible de la célula hacia la muerte. Se da como consecuencia de un estímulo apoptótico que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos, junto con cambios en el tamaño y la forma celular. Una fase degradativa, en la que se destruyen las proteínas y los ácidos nucleicos, a la vez que ocurren cambios en la fisiología de la membrana celular y en el citoesqueleto. Por último, una fase de eliminación en la que los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por la fosfatidilserina, impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación.

Tanto caspasa 3 como caspasa 7 presentan un interés significativo para diseñar estrategias terapéuticas frente a enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Son muchas las evidencias que conectan la apoptosis con estas enfermedades. La muerte neuronal causada por apoptosis aberrante subraya los principales signos de enfermedades como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis múltiple, Huntington's entre otras. Mientras que la inactivación de la apoptosis debido al bloqueo de señales de muerte celular o inhibición de caspasas, deriva en desarrollo de cáncer y resistencia celular hacia los agentes anticancerígenos (Kang et al., 2008). El desafío real consiste en tomar esta información y traducirla en terapias efectivas.

El interés en maniobrar la apoptosis para inducir la muerte de células no deseadas o por el contrario, preservar las células irremplazables como las neuronas y mantener la función de un órgano, se ve plasmado en la fuerte línea de investigación que actualmente posee.

1.5) *Echinococcus granulosus* como modelo de estudio.

Echinococcus granulosus (*E. granulosus*) es desde hace muchos años un parásito de gran importancia médica que acorde a la Organización Mundial de la Salud, su infección es endémica para América del Sur, Europa del Este, Rusia, Medio Oriente y China, y cuya incidencia alcanza 50 de cada 100.000 personas por año (Pakala et al., 2016). Hospederos intermediarios y definitivos son los que mantienen el ciclo de *E. granulosus* en la naturaleza. El parásito adulto reside en el intestino delgado de cánidos, su hospedero definitivo, eliminando sus huevos a través de las heces. Estos huevos son ingeridos por hospederos intermediarios como ovejas o cabras, en donde eclosionan liberando sus embriones u oncosferas, las cuales penetran en la pared intestinal y migran a través de la circulación sanguínea y linfática alcanzando varios órganos, especialmente el hígado y los pulmones. Una vez allí, la oncosfera se enquista (estadio larvario), los quistes crecen y se desarrollan produciendo protoescólex. El ser humano, resulta un hospedero accidental que se infecta al ingerir estos huevos presentes en alimentos o aguas contaminadas, o por contacto directo con el hospedero intermediario. El hospedero definitivo se infecta al ingerir vísceras con quistes de los hospederos intermediarios. Luego de la ingesta, los protoescólex se evaginan, se adhieren a la mucosa intestinal y se transforman en adultos, iniciando el ciclo nuevamente (Paredes et al., 2007; figura 7).

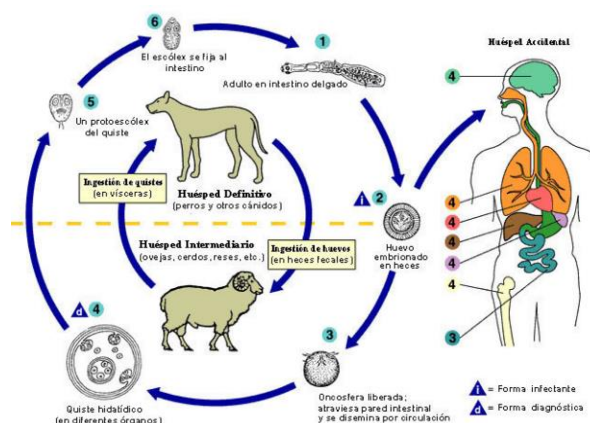


Figura 7. Ciclo biológico de *E. granulosus*. Modificado de www.cdc.gov.

Cabe destacar que algunos autores asocian la apoptosis a la infertilidad del quiste hidático, es decir, a su incapacidad de producir protoescólex. Aún son desconocidas las razones por las que algunos quistes son infértiles, pero la fragmentación del ADN analizada por TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling) y posterior visualización en electroforesis en gel de agarosa evidenciando su patrón de bandas característico, mostró un índice apoptótico más alto en quistes infértiles que en quistes fértiles. La actividad de caspasa3 detectada, como era de esperar, también fue más alta en los quistes infértiles (Paredes et al., 2007).

Las formas larvarias infectivas de estos parásitos se caracterizan por presentar formaciones calcáreas denominadas corpúsculos calcáreos (CCs). Estos, se desarrollan por un proceso de mineralización dentro de una célula de origen parenquimatoso. En la misma, se produce una ruptura del citoplasma con formación de una vacuola que va a desarrollar el CC, y una vez alcanzada su maduración, la célula desaparece por un proceso que fue descrito como autólisis (Smith et al., 1993). Se ha identificado una etapa tardía en el desarrollo del CC en la que las células asociadas muestran un núcleo periférico y masas de cromatina condensada. Sin embargo, no se han detectado células fagocíticas en las cercanías de esta célula asociada al CC, lo que genera cierta incertidumbre sobre si se estaría dando el proceso apoptótico tradicional en este tipo celular (Chalar, 2010). Resultados de la aplicación de la técnica de TUNEL pusieron de manifiesto la fragmentación del ADN en algunas de las células asociadas a CC (Chalar, 2016) así como un aumento de la actividad caspasa-3, características esenciales de la apoptosis que vuelven a sugerirla como la estrategia utilizada por estas células durante el proceso de maduración del CC (Chalar, 2010; Paredes et al., 2007).

Por tanto, dentro de este marco y en línea con la investigación que se desarrolla en la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias, se buscó contribuir al conocimiento del desarrollo de la muerte celular programada en este organismo.

1.6) Hipótesis de investigación

A medida que se ha profundizado en los conocimientos sobre el proceso de muerte celular programada, surge la hipótesis de que existe conservación a nivel molecular de los mecanismos implicados en la vía apoptótica de los metazoarios.

1.7) Objetivo general

Contribuir a la comprensión de la vía apoptótica en *E.granulosus*, a través de la caracterización de las moléculas implicadas en ella.

1.8) Objetivos específicos

- identificación y caracterización del ADNc que codifica para la caspasa3Eg.
- Predecir la estructura conformacional de caspasa3Eg
- Estudiar el patrón de expresión de caspasa3Eg

1.9) Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos descritos se diseñó la siguiente estrategia experimental:

- a) Obtención del material parasitario
- b) Clonado del gen caspasa3Eg
- c) Modelado molecular de caspasa3Eg
- d) Inducción de la expresión del gen caspasa3Eg
- e) Purificación de la proteína recombinante caspasa3Eg
- f) Obtención de anticuerpos específicos anti-caspasa3Eg, que permitan futuros estudios inmunohistoquímicos de la distribución de caspasa3Eg durante los diferentes estadios de desarrollo del CC.

2) MATERIALES Y MÉTODOS

El material de partida para este trabajo fueron protoescoléx de *Echinococcus granulosus* donados por la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene. Los mismos fueron extraídos de quistes hidáticos de pulmón e hígado de bovinos infectados y lavados sucesivas veces con tampón fosfato salino (PBS) estéril previo a su uso.

2.1) Obtención de caspasa3Eg

En primer lugar se realizó la esterilización de todo el material a utilizar por Autoclave durante 20 minutos a 121°C. El material de vidrio fue tratado con agua-DEPC: (Dietilpirocarbonato) en una dilución de 1/1000 a 37°C ON, ya que por su reactividad frente a histidinas permite inactivar fundamentalmente ARNasas, y posteriormente autoclavado para eliminar las trazas de DEPC.

2.1.1) Extracción de ARNEg total

Se realizó la extracción de ARN de protoescoléx de *E. granulosus* mediante el método basado en Tiocianato de guanidina utilizando 2 mL del reactivo TRIzol (*life-technologies* #15596-026) siguiendo el protocolo descrito por P. Chomczynski & Sacchi, 1987. Los protoescoléx fueron triturados en mortero seguido de la ruptura mecánica del lisado mediante un homogenizador de tipo Elvehjem Potter. Una centrifugación de 20 minutos, 8000 rpm a 4°C permitió que precipiten los restos celulares y recuperar los ácidos nucleicos y las proteínas resuspendidos en el sobrenadante. Mediante el agregado de 0.4mL de cloroformo se logró la separación de fases que deja al ARN en la fase acuosa, mientras que ADN y proteínas quedan en la interfase. Una nueva centrifugación de 30 minutos a 8000 rpm a 4°C, permitió recuperar la fase acuosa conteniendo el ARN. Un volumen de isopropanol fue agregado para dejar precipitando el ARN a 4°C overnight (ON). Luego fue centrifugado durante 30 minutos a 10000 rpm a 4°C, lavándose el pellet obtenido con etanol 70%. El precipitado se secó bajo luz de lámpara y el ARN fue resuspendido en agua milliQ.

2.1.2) Cuantificación del ARNEg

A través de un equipo NanoDrop (Thermo Scientific) fue medida la concentración del ARN obtenido. Este equipo permite también establecer el grado de pureza de la muestra en cuanto a la presencia o no de proteínas. Mediante la relación de absorbancia entre $\lambda=260$ y $\lambda=280$ nm que el equipo mide, se toman como referencia los parámetros ya estandarizados considerándose pura una relación mayor o igual a 1.8.

2.1.3) Evaluación del ARNEg

Con el fin de comprobar la integridad del ARN obtenido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en solución amortiguadora TAE 1X. La tinción fue realizada con 2 μ L de GelRed (Biotinium) por cada 1000 μ L de solución amortiguadora de carga 6x. GelRed es un compuesto que se intercala entre las bases nitrogenadas y que fluoresce cuando se expone a luz UV mostrando un color anaranjado que se intensifica al estar unido al ácido nucleico.

2.1.4) Tratamiento con DNAsa

Siguiendo el protocolo para el tratamiento con la enzima RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101, Promega), 6 μ g del ARN obtenido fueron incubados con la misma a fin de eliminar restos de ADN contaminantes. Sabiendo que su modo de acción es la degradación del ADN doble y simple cadena, fue posible obtener una mayor pureza del ARN.

Mediante una nueva extracción con fenol ácido, seguida de una centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa conteniendo ARN libre de ADN y DNasa. Se agregó 1/10 del volumen recuperado o de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol para dejar precipitando ON a -20°C. El ARN fue resuspendido en 10 μ L de agua milliQ y se volvió a cuantificar a través del NanoDrop (Thermo Scientific).

2.1.5) Reacción de retrotranscripción

El ARN de *E. granulosus* obtenido, fue sometido a una reacción de retrotranscripción, siguiendo el protocolo propio de la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Esta es una retrotranscriptasa que permite la síntesis de ADN a partir de ARN simple hebra, obteniéndose de esta forma el ADN copia (ADNc).

2.1.6) Evaluación del ADNc

La integridad del ADNc sintetizado fue evaluada mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para un gen de alta expresión en *E. granulosus* que codifica para una proteína de unión a ácidos grasos: FAB1 (PDB: 10V8). Información sobre su secuencia nucleotídica puede verse en NCBI (código de secuencia CAA46765.2) de donde fueron diseñados los siguientes cebadores con los que se realizó la PCR:

cebador forward: 5`ATGGAGGCATTCCTTGGTACC3`

cebador reverse: 5`CGCCACCTTTGAGTAGGTTTCG3`

La razón por la cual esta estrategia permite evaluar el ADNc obtenido es debido a que este gen posee un intrón. Esto significa que si luego de la extracción del ARN hubiesen quedado trazas de ADN, con el ADNc sintetizado a partir del ARNm *fab-1* (de 399pb) también estaría el gen en su tamaño original (con el intrón: 519pb). Por lo tanto, al realizar la PCR, la visualización en un gel de los productos, permitirá distinguir una o dos bandas de distinto tamaño acorde a la pureza o no del ADN obtenido. La PCR fue realizada con la enzima *Taq polimerase* (Invitrogen) en las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización: 94°C durante 30 segundos; temperatura de apareamiento de los cebadores: 58°C durante 30 segundos; y temperatura de reacción de polimerización: 72°C durante 30 segundos, repitiéndose un total de 34 ciclos. Los productos de PCR fueron visualizados en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X.

2.1.7) Diseño de cebadores para caspasa3Eg.

Para diseñar los cebadores necesarios para la amplificación del gen caspasa 3 mediante PCR, fue necesario realizar una búsqueda bioinformática de la secuencia de dicho gen. Para ello se recurrió a la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) encontrándose la secuencia aminoacídica para caspasa3Eg, reportada como CDS19333 y compuesta por 335 aminoácidos. La secuencia nucleotídica que codifica para dicha proteína se muestra a continuación y en ella se subrayan los cebadores diseñados y mandados a sintetizar.

ATGGAGAACAAGGTTTTGTCTTCAAAACCCACTGCCGATATTCCAGTTAAGGACGATGCTGAGGATGCCA
GTTTTATTTTCTCCTCGACAGGAGGTAAGGCGTCCCCGACACCACGAGGGACGACGTCACCGTGCCAGGC
CTCACCGACGCTTTTCGAAAAGCGTTAAGCCGGCAGAAAGTGACAACAGGAATCGGAAGTGGTGATAGACGA
AGATACCTCAGCGAGATTGAGCTCTGCGACCCTGACCTTGGATACCCGCGGGTGGCGAACCCCTACCAATC
GTAGTAATCCGCGCGGTGTCTGCCTCCTCATCAACCAGCGCGATTTTGATTCAGCCAAGACCGGGCAGGA
GCGCCGTGACGGCACCGATGTGCGATGCGGACAATATCGAACGCACCTTTCATTCGCTGTGGCTACGCTGTT
AACCGCGCTACCAATCTCACGCTCCGGAAAATGGAGTTTCTTCTTGATGACGTGCGATCGCAGAACCACA
GTAAGTACGACAGCTTTGCTTGCCTCATCCTTAGCCATGGCGCTGAGGGGATTGTCTACGCCTCCGACGG
GACCATCAACGTTGATCGTCTCATCGGATACTTCCGCTCCGATAGGTGCCCTACCCTCGCTGGCAAACCG
AAAATGTTCTTTATTCAGGCCTGCCGAGGCTGCAAGTTCGATAAAAGGTGTCACCTCTCTACGGATGCTA
GCTCGGACTCTGTGCTTGTACAAAGCTCCCCATCGAGGCCGACATCTTCGTCGCTAACTCAACCTTTCC
CGGTTACTACGCTTGGCGCAACTCGCACGCAGGCAGTTGGTTCATCCAGGAATTGTGCAAGGTGATAAAG
GCGGCGCAGGAGTCAGGCCGCATCACGACGTGGCTCACTATTGACAGTGGTGGCACGCAAAGTGGCAC
TGCTCTACGAGTCGAACACAGGCCAGAGCGACTCCCACGGCAGTAAGCAGATGGTGAGCGTAAACTCCAC
ACTTACCCGCAAGGCCTTCATCGTCTGA

Por tanto los cebadores utilizados fueron:

cebador forward caspasa3-F1: 5' **ATGGAGAACAAGGTTTCGTCTTC** 3'

cebador forward caspasa3-F4: 5' **GGGACGACGTCACCGTGCCAGG** 3'

cebador reverse caspasa3-R1: 5' **ACGATGAAGGCCTTGC GGGTAAG** 3'

2.1.8) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ensayo realizado con el par de cebadores caspasa3-F4 y caspasa3-R1 utilizando la enzima Taq *polimerase* (Invitrogen), fue el que obtuvo resultado positivo para la amplificación. Las condiciones óptimas para esta PCR fueron: temperatura de desnaturalización 94°C, temperatura de apareamiento 58°C y temperatura de elongación 72°C repetidos 35 ciclos. Los productos de la PCR siempre fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE1x. La banda obtenida que presumiblemente corresponde a caspasa3Eg por ser del tamaño esperado, fue recortada y purificada mediante PureLink® Quick Gel Extraction Kit #K210010 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2) Clonado de caspasa3Eq

2.2.1) Ligación a pGEM T Easy Vector.

Luego de purificado y cuantificado a través de NanoDrop (Thermo Scientific), el amplicón obtenido fue ligado al vector de clonado pGEM T Easy Vector (Promega), respetándose la relación establecida por el protocolo y dejándose incubar la mezcla a 4°C ON (ver anexo 1). Este es un plásmido linealizado en cuyos extremos 3' se encuentra la desoxitimidina, que al quedar desapareada, previene la recircularización del vector a la vez que ofrece los extremos compatibles para ligar productos de PCR 3'A, mejorando así la eficiencia de la ligación. Es un vector de alto número de copias que contiene los promotores universales T7 y SP6 para la RNA polimerasa, los cuales flanquean el sitio de clonado interrumpiendo el gen lacZ en la subunidad α , codificante para la enzima β -galactosidasa, muy útil para diferenciar colonias bacterianas con el plásmido recombinante (ver sección 2.2.3). Además, este plásmido presenta resistencia al antibiótico ampicilina, también facilitando la selección de colonias transformantes. Como lo muestra la siguiente imagen, pGEM T Easy Vector contiene varios sitios de restricción en el sitio de clonado, el cual se haya entre sitios de restricción para las enzimas EcoRI, BstZI y NotI, ofreciendo la posibilidad de digerir con cualquiera de estas tres enzimas para liberar el inserto.

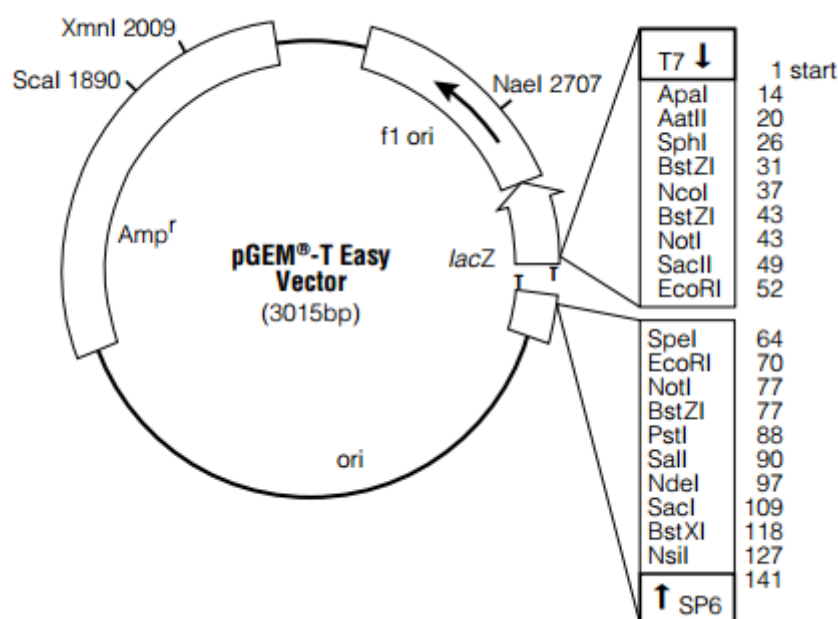


Figura 8. Mapa de pGEM T Easy Vector (Promega). Extraído de www.promega.com.

2.2.2) Transformación en DH5 α de *E. coli*

Células quimiocompetentes de la cepa DH5 α de *E. coli*, fueron transformadas con la mezcla de ligación mediante un choque térmico a 42°C (ver anexo 1). Luego se plaquearon 100 y 150 μ L de la transformación en placas con medio LB-Agar + ampicilina 100 μ g/ml + Xgal 40 μ g/mL + IPTG 40 μ g/mL dejándose en estufa a 37°C ON (ver sección 2.2.3).

2.2.3) Selección de las colonias transformantes

La selección de las colonias transformadas con el plásmido recombinante pudo hacerse por la llamada complementación en α . Este método se basa en que el producto de expresión del gen lacZ es la enzima β galactosidasa, un tetrámero compuesto por dos tipos de péptidos distintos: LacZ α y LacZ Ω . Ambos son necesarios para que la enzima sea funcional. Ciertas cepas de *E. coli* expresan constitutivamente solo LacZ Ω , por lo que si son transformadas con un plásmido que aporta LacZ α , la funcionalidad de la enzima se ve restaurada. β galactosidasa cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos. El galactósido más conocido, es la lactosa: disacárido de galactosa-glucosa. X-gal es un compuesto orgánico que por su analogía con la lactosa, sirve de sustrato para la enzima β galactosidasa, con la ventaja de que el producto final de su hidrólisis es galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, éste último se oxida y da un producto insoluble de color azul (Sambrook et al., 1989). Por tanto, si se utiliza un inductor de la β galactosidasa, como el IPTG disuelto en el agar, aparecerán colonias transformadas con plásmido salvaje de color azul. Pero, si algunas células de *E. coli*, incorporaron el plásmido recombinante con el inserto de caspasa3Eg en el sitio de clonado, el gen lacZ estará interrumpido y no podrá aportar la subunidad para que β galactosidasa sea funcional. De esta manera las colonias transformadas con el plásmido recombinante aparecerán de color blanco. Estas fueron seleccionadas y se pasaron a tubos de precultivo con 3 mL de LB + 3 μ L ampicilina 100 mg/mL a 37°C ON.

2.2.4) Análisis del ADN plasmídico

Una vez crecidas las colonias seleccionadas, se realizó la extracción del ADN plasmídico a través del PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit #K210010 (Invitrogen). Para verificar que el plásmido fuera recombinante se realizó la digestión del ADN plasmídico con la enzima EcoRI (Biolabs), que como se dijo anteriormente, presenta dos sitios de restricción a los lados del sitio de clonado. Los productos de la digestión fueron visualizados mediante una

electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE1x. Se utilizó un marcador de peso molecular que permitió comparar con el tamaño esperado para el inserto caspasa3Eg, que debido al cebador caspasa3-F4 utilizado, sería de 887 pb.

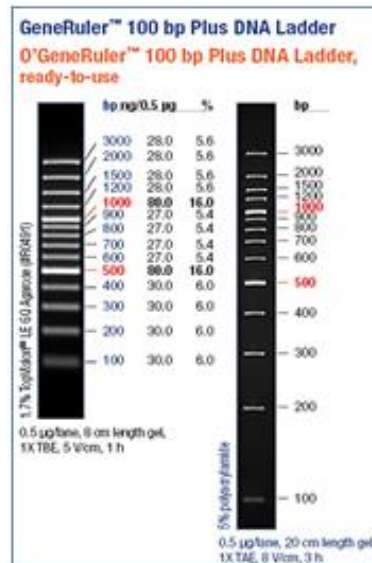


Figura 9. Marcador de tamaño 100bp. Extraído de www.thermoscientificbio.com.

2.2.5) Identificación de caspasa3Eg

Luego de visualizar en el gel cuales plásmidos liberaron un fragmento a la altura del tamaño esperado, fue necesaria la confirmación de que ese inserto correspondía a caspasa3Eg y evaluar la orientación en la que se clonó dicho inserto. Para esto se realizó la secuenciación del plásmido en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (IP).

2.2.6) Análisis bioinformático de secuencia

Luego de realizar la traducción conceptual de la secuencia obtenida en el programa GeneRunner.exe., se procedió a realizar una comparación de la secuencia proteica con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) a través de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool - protein (BLASTp) del servidor NCBI (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), y un BLASTp en la base de datos de *E. granulosus* (www.genedb.org). Se realizó también un alineamiento con secuencias nucleotídicas de caspasa3 de otros organismos para estudiar sus similitudes a través de la herramienta ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Además, se utilizó el

software ProtParam-ExPASy Tools (<http://web.expasy.org/protparam>) pudiéndose obtener información teórica acerca del peso molecular y el punto isoeléctrico de la proteína.

2.3) Modelado molecular de caspasa3Eg

Se realizó la predicción de la estructura proteica en 3D para caspasa3Eg por homología utilizando el software Bioinformatics Toolkit de Max Planck Institute for developmental Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Se eligió la proteína caspasa3 del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (PDB: 4M9R) con la cual presenta una identidad de secuencia del 38%, por ser hasta la fecha, la única cristalografía de caspasa3 de helmintos reportada. El modelo obtenido fue analizado a través del programa PyMOL Molecular Graphics System, y a su vez, fue comparado visualmente con el modelo estructural para caspasa3 humana (PDB: 4QU0).

2.4) De vector de clonado al vector de expresión.

2.4.1) Preparación del vector de expresión

Se eligió el vector de expresión pET22b(+) (Novagen) para generar la proteína de fusión y expresar la proteína recombinante caspasa3Eg. Este es un vector de 5493 pb que presenta resistencia a ampicilina y tiene la secuencia codificante para la señal de localización periplásmica. Tiene un sitio de múltiple clonado flanqueado por el promotor T7 que permite la inserción de ADN a través de sitios de reconocimiento para varias enzimas de restricción, como se esquematiza en la figura 9. Este vector además, presenta una secuencia codificante para seis histidinas consecutivas entre las posiciones 140 y 157, comúnmente conocida como His Tag Coding Sequence, que será de gran ventaja al momento de la purificación de la proteína de fusión.

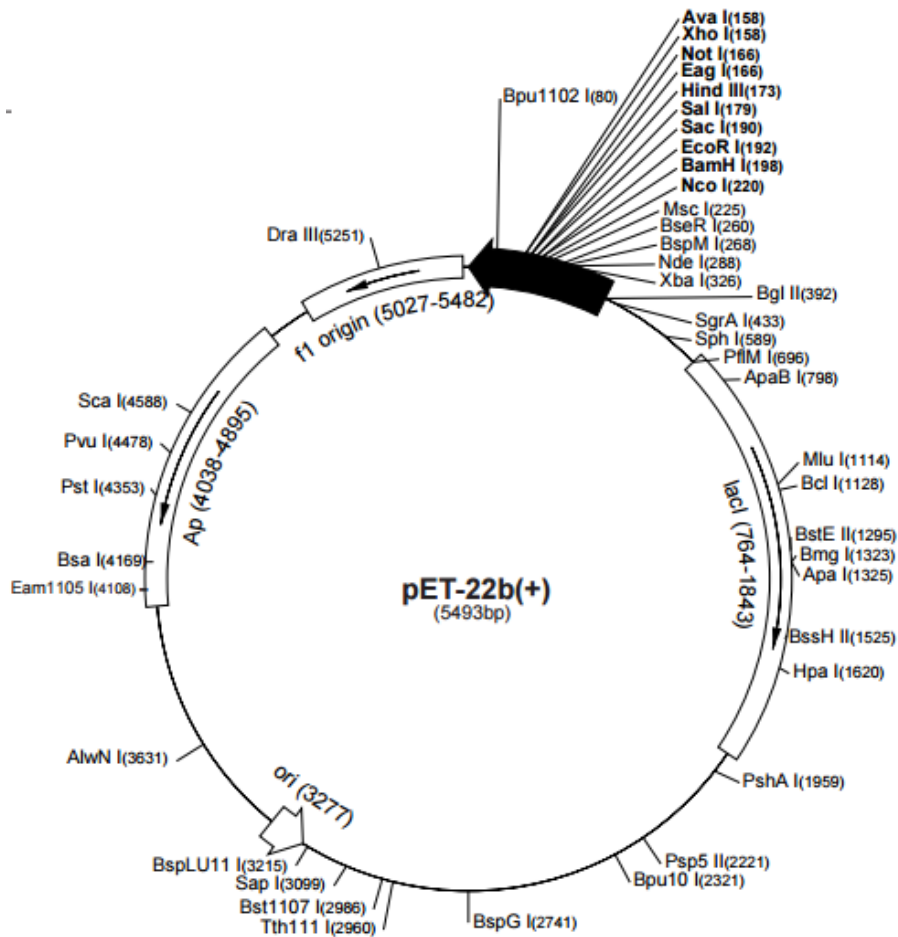


Figura 10. Mapa del vector pET22b(+). Extraída de www.addgene.org.

pET22b(+) fue digerido con las enzimas NdeI y XhoI (Invitrogen) con la finalidad de obtenerlo en conformación lineal y apto para el clonado del inserto. Un previo análisis de las solución amortiguadoras en que actúan estas enzimas fue realizado a modo de encontrar un mismo amortiguador compatible para ambas (ver anexo 1). Los productos de la digestión fueron visualizados en electroforesis de agarosa 1% en solución amortiguadora TAE 1X utilizando un marcador de tamaño de 1 kb (Thermofisher) como se muestra a continuación.

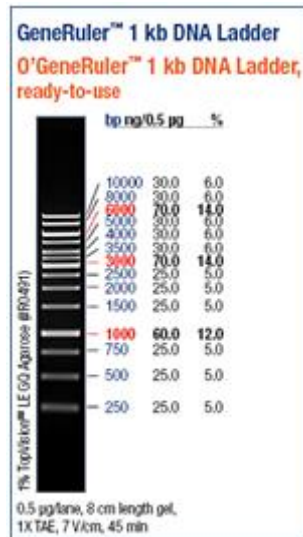


Figura 11. Marcador de tamaño 1kb. Extraída de www.thermoscientificbio.com.

Se realizaron sucesivas digestiones del vector y las bandas correspondientes a la conformación lineal fueron recortadas y purificadas por PureLink Quick gel Extraction Kit #K210012 (Invitrogen). El ADN del vector se precipitó ON con el fin de obtenerlo a una mayor concentración (ver anexo 1) y nuevamente se purificó por una columna PureLink Quick gel Extraction Kit #K210012 (Invitrogen) para eliminar las sales. Luego fue cuantificado a través del equipo NanoDrop (Thermo Scientific) viéndose finalmente que su concentración permitía proceder a la ligación.

2.4.2) Tratamiento del ADN caspasa3Eg

Paralelamente, se diseñaron oligos para caspasa3 que poseían en sus extremos sitios de restricción para las enzimas NdeI (5'CATATG3') y XhoI (5'CTCGAG3').

cebador caspasa3-F5: 5'AAA CAT ATG GGG ACG ACG TCA CCG TGC CAG 3'

cebador caspasa3-R5: 5'AAA CTC GAG AAC GAT GAA GGC CTT TGC GGG TAA G 3'

Usando como molde el plásmido recombinante pGEM T Easy-caspasa3Eg se amplificó el gen caspasa3Eg con los cebadores F5 y R5 generando extremos aptos para el clonado del mismo en el vector pET22b(+) ya preparado. Las condiciones para esta PCR fueron: temperatura de desnaturalización 94°C, temperatura de apareamiento 54°C, y temperatura de elongación 72°C, por un total de 35 ciclos. Los productos de PCR fueron visualizados en

una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X. Las bandas a la altura del tamaño esperado fueron recortadas y purificadas por PureLink Quick gel Extraction Kit #K210012 (Invitrogen).

2.4.3) Subclonado del amplicón

El nuevo amplicón conteniendo los sitios de restricción para NdeI y XhoI fue clonado en el plásmido pGEM T Easy Vector (Promega). Para ello se realizó la ligación utilizando la enzima T4 ADN ligase 3U/uL (Promega) dejándosela actuar a 4°C ON (ver anexo 1). Con la mezcla de ligación fueron transformadas células DH5α de *E. coli* quimiocompetentes (ver anexo 1). 100 y 150 uL de la transformación fueron sembrados en placas LB-agar + ampicilina 0.1mg/mL + Xgal 40ug/uL + IPTG 40ug/mL. Basándose en la selección por complementación en α explicada previamente, colonias blancas fueron picadas y pasadas a tubos de precultivo con 3 mL de LB + 3 uL ampicilina 100mg/mL y crecidas con agitación a 37°C ON. Luego de extraer el ADN plasmídico por PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit #K210010 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se obtuvo el ADN del plásmido pGEM T Easy - caspasa3Eg_{modificada} ya pronto para la digestión.

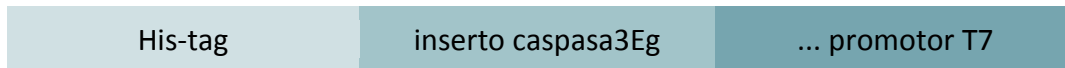
2.4.4) Preparación del inserto

Se incubaron 5 uL de ADN del plásmido recombinante con la enzima NdeI y la solución amortiguadora correspondiente durante 2 horas a 37°C. Luego se le agregó 1 uL de enzima XhoI y se dejó actuar 2 horas más a la misma temperatura. El producto de la digestión fue visualizados a través de una electroforesis de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X. La banda correspondiente al inserto fue recortada y purificada a través del PureLink Quick gel Extraction Kit #K210012 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante, y cuantificada en un NanoDrop (Thermo Scientific). Sin embargo, el rendimiento obtenido fue bajo, por lo que se dejó precipitando el ADN digerido a -20°C ON. Una vez resuspendido, se pasó nuevamente por una columna del kit usado anteriormente a modo de purificación y volvió a ser cuantificado. Habiéndose llegado a la concentración requerida, se procedió a ligar el inserto al vector pET22b(+).

2.4.5) Ligación.

Junto con 1 uL de enzima T4 ADN ligasa 3U/uL (Promega), se incuban 4 uL del inserto

caspasa3Eg digerido con 1 uL NdeI (10U/uL) y 1 uL XhoI (10U/uL), con 1 uL de pET22b (+) digerido con las mismas enzimas, y 5 uL de la solución amortiguadora T4 ligasa, a 4°C ON (ver anexo 1). El resultado de esta ligación debería ser un plásmido recombinante cuya secuencia se esquematiza de la siguiente manera:



2.4.6) Transformación de células Dh5α de *E. coli*.

Con el producto de la ligación, se transformaron células quimiocompetentes Dh5α de *E. coli* por choque térmico a 42°C (ver anexo 1). Se plaquearon 100 y 150 uL en LB agar + ampicilina 100 ug/mL y se incubaron a 37°C ON.

2.4.7) Análisis de los clones.

Se realizó un análisis de las colonias crecidas, picando varias al azar y pasándolas a tubos de precultivo con 3 mL de medio LB + 3uL de ampicilina 100 mg/mL. Luego de realizar la extracción del ADN plasmídico siguiendo el protocolo para minipreparaciones alcalinas (ver anexo 1), se realizaron las digestiones con XhoI y NdeI y la consiguiente electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluarla. De esta manera, se determinó cuáles colonias habían incorporado el plásmido recombinante al comprobar que liberaron el inserto a la altura aproximada de 900 pb como era lo esperado para caspasa3Eg. Los clones identificados como recombinantes se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación del IP comprobándose la identidad de los mismos.

2.5) Inducción de la expresión de caspasa3Eg

2.5.1) Ensayo en cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*

Se eligió la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* para realizar la inducción ya que permite una expresión eficaz para aquellos genes que están bajo el control del promotor T7 y ofrece un sitio de unión al ribosoma. Además, pLysS es un plásmido que contiene el gen de la lisozima del fago T7 que disminuye los niveles de expresión basal de los genes dependientes del promotor T7, sin interferir con los niveles de expresión que se alcanzan cuando se induce con IPTG. DE3 indica que esta cepa es lisogénica para el fago λ-DE3, que expresa la ARN

polimerasa de T7 bajo el control del promotor lacUV5 (Sorensen et al., 2004). El IPTG es requerido para inducir la expresión de la ARN polimerasa de T7 que lleva a expresar el gen clonado corriente abajo del promotor T7. Además esta cepa es deficiente en proteasas Lon y OmpT, lo que reduce la posibilidad de degradación de proteínas heterólogas. Por lo tanto, resultaba adecuada para producir proteínas a partir de vectores pET inducidos con IPTG.

Precultivos crecidos de BL21(DE3)pLysS de *E. coli* fueron centrifugados para descartar el medio de cultivo y realizar una transformación de baja eficiencia por choque térmico. El precipitado de bacterias resultante fue tratado con CaCl₂ 0.1M estéril y frío, seguido de una incubación en hielo. De esta manera, las células se vuelven competentes para aceptar el plásmido recombinante pET22b(+)-caspasa3Eg. Una vez plaqueada la transformación, se realizó un análisis de las colonias crecidas pasándolas a precultivo (generándose un respaldo de cada colonia analizada), con posterior minipreparación alcalina y digestión enzimática con enzimas NdeI y XhoI (ver anexo 1). Las digestiones se visualizaron en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE1X.

2.5.1a) Inducción en medio LB

Se eligió una de las colonias transformadas para inocular un matraz con 50 mL de medio LB a modo de prueba de la inducción. Se dejó crecer el cultivo a 37°C en agitación realizando el seguimiento del mismo a través de la medida de densidad óptica (DO) a $\lambda=600\text{nm}$. Cuando se alcanzó una DO=0.8, se agregó IPTG 0,5mM para inducir la expresión durante 4 horas. Luego se procesó el cultivo descartando el sobrenadante mediante centrifugación a 5000rpm en la centrífuga refrigerada Beckman J2-21 utilizando el rotor JA20. Las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de sonicación y se realizaron ciclos de congelación y descongelación para facilitar la ruptura de las paredes bacterianas. Luego se realizó el sonicado utilizando micropunta con 40% de amplitud y 20% de pulso durante 15 minutos, y se guardó una alícuota que denominamos extracto total (ET). La muestra fue centrifugada a alta velocidad en la ultracentrífuga Beckman J2-21, a 15000rpm a 4°C durante 20 minutos obteniéndose así la fracción soluble. El precipitado fue resuspendido en solución amortiguadora de sonicación + urea 8 M y se volvió a centrifugar en iguales condiciones, obteniendo así la fracción insoluble. Todas las muestras se visualizaron a través de un gel de poliacrilamida al 12%, sembrándose: alícuota sin inducir (F0), alícuota inducida

(FI), fracción soluble (Fsol) y fracción insoluble (Fins), utilizando como referencia el marcador de peso molecular PageRuler prestained protein Ladder 10-180 kDa (Thermo) que se muestra a continuación.

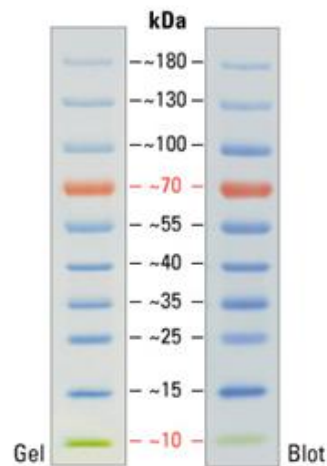


Figura 12. MPM 1kb. Extraído de www.thermofisher.com.

Como no se observó inducción de la expresión de *capasa3Eg* en las condiciones descritas, nuevos ensayos fueron realizados.

2.5.1b) Inducción en medio ZYM

Manteniendo básicamente el mismo protocolo, se decidió cambiar el medio de cultivo por uno más rico en nutrientes y con la propiedad de ser autoinductor: ZYM (Studier, 2005; ver anexo 2). Esto significa que no es necesario el agregado de IPTG, pero a cambio se dejó el cultivo 12 horas en agitación a 37°C para inducir la expresión de la proteína. Además, para tener un control de la expresión basal se hizo en paralelo el mismo procedimiento para un cultivo de BL21(DE3)pLysS de *E. coli* transformado con pET22b(+) nativo. Luego del procesamiento de las muestras en las condiciones descritas (ver sección 2.5.1a), se corrieron las alícuotas en un gel de poliacrilamida al 12% pero nuevamente no se observó inducción de la expresión.

2.5.1c) Inducción en medio ZYM a 20°C

En base a la bibliografía consultada y la experiencia del laboratorio, se decidió realizar la inducción de la expresión a una temperatura más baja. Para ello, se mantuvo el protocolo ya descrito, con la modificación de que cuando el cultivo llegó a una DO=0.8, se trasladaron los

matraces a un agitador con una temperatura de 20°C ON. Luego del procesado de las muestras (ver sección 2.5.1a), se corrieron las fracciones en un gel de poliacrilamida al 12% recurriendo al servicio de espectrometría de masa de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IP (UByPA) para la identificación de la presunta banda.

2.5.2) Western blot

Sabiendo que el resultado del UByPA se recibiría en un tiempo, se decidió mientras tanto repetir el experimento y realizar una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Science #10600018), que permitió realizar un Western blot (WB) utilizando como anticuerpo primario α HIS-tag (ver anexo 1).

2.5.3) Análisis del uso de codones

Es sabido que no todos los organismos utilizan codones con la misma frecuencia, y por ende, el conjunto de ARNs de transferencia, puede ser una limitante para la expresión. De hecho, han sido publicadas tablas estandarizadas con la frecuencia del uso de codones en *E. coli* (www.GenScript.com). Por esta razón, se decidió utilizar una cepa de *E. coli* diseñada experimentalmente para reforzar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones de uso raro por esta bacteria. Este es el caso de la cepa llamada Rosetta, la cual suplementa a través de un plásmido, ARNs de transferencia para los siguientes codones: AUA, AGG, AGA, GGA, CCC, CUA.

2.5.4) Ensayo en cepa Rosetta de *E. coli*

Se procedió a la transformación de cepas quimiocompetentes Rosetta con el plásmido recombinante pET22b(+)-caspasa3Eg (ver anexo 1). 150 μ L de la transformación fueron plaqueados en medio LB agar con ampicilina 100 μ g/mL e incubadas a 37°C ON. 24 horas más tarde se observaron colonias que en condiciones de esterilidad, se llevaron a un precultivo de 3 mL de medio de cultivo Terrific Broth (TB) dejándose en agitación a 37°C ON. Con 1 mL del precultivo crecido, se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio TB + solución amortiguadora fosfato de potasio [KH_2PO_4 0.17M: K_2HPO_4 0.72M] y los antibióticos requeridos: cloranfenicol 34 mg/mL y ampicilina 100 mg/mL, dejándose en agitación a 37°C ON (ver anexo 2). Con 35 mL del segundo precultivo crecido, se inoculó un matraz de 2 litros conteniendo 400 mL de medio TB + 15 mL de solución amortiguadora fosfato de potasio. El

mismo se dejó en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO de 0,5. En ese momento, se extrajo una alícuota que se guardó como fracción sin inducir (F0) y en seguida se pasó el cultivo a un agitador con temperatura 20°C. Una hora después, se agregó IPTG 0.5mM y se dejó el cultivo en el agitador a 20°C ON.

2.5.5) Procesamiento de las muestras.

El cultivo celular se sometió a una centrifugación a 5000 rpm a 4°C en la centrífuga refrigerada Beckman J2-21 utilizando el rotor JA-10, lo que permite concentrar las células y descartar el medio. Se pudo determinar el peso del pellet bacteriano por diferencia de peso con una botella vacía. De esta forma, las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora fosfato salino (PBS) 2X, DTT 0.5 mM, PMSF 1 mM (ver anexo 2), utilizando una relación de 3 mL de solución amortiguadora por cada gramo de bacterias. Ciclos de congelado y descongelado ayudaron a la ruptura física de las paredes bacterianas. Igualmente, lisozima fue agregada a una concentración final de 1 mg/mL dejándola actuar durante 30 minutos en hielo (ya que lisozima hidroliza enlaces β 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en el peptidoglicano de paredes bacterianas). Para seguir con la lisis celular, se sonicaron las células usando micropunta a 40% de amplitud, 20 % de pulso durante 15 minutos. Para clarificar la preparación, se incubó la muestra con DNasa a una concentración final de 5ug/mL durante 1 hora a temperatura ambiente guardándose una alícuota como extracto total (ET), que gracias a la degradación del ADN bacteriano, pudo ser fácilmente sembrada en un gel. Se prosiguió con una nueva centrifugación a 15000 rpm a 4°C durante 20 minutos en la ultracentrífuga Beckman J2-21 utilizando el rotor JA-20, que permitió la obtención de la fracción soluble (Fsol). El precipitado resultante, fue resuspendido en solución amortiguadora TrisHCl 20mM pH 8.3 Urea 2M (3 mL por cada gramo de precipitado) y le siguió otra centrifugación en iguales condiciones obteniéndose así la fracción insoluble (Fins). Todas las fracciones fueron evaluadas en geles de poliacrilamida al 15% en solución amortiguadora de corrida SDS-PAGE 1X.

2.6) Purificación de caspasa3Eg

2.6.1) Cromatografía de afinidad

Se realizó la purificación de las fracciones soluble e insoluble a través de cromatografía de afinidad a metales en columna de Níquel-ácido nitrilotriacético: Ni-NTA (QiaGen). Esta se basa en que el níquel ofrece sitios de unión que interaccionarán con el tren de histidinas de la caspasa3Eg, lo que permitirá separarla del resto de las proteínas de la fracción correspondiente. Durante la misma, se aplicó el método visual con reactivo de Bradford para determinar la presencia/ausencia de proteínas de una manera sencilla y rápida, ya que se produce un cambio de color cuando este reactivo entra en contacto con proteínas. Para esto, varios pocillos de una placa de ELISA fueron sembrados con 140 uL del reactivo, y a medida que se realizaron los lavados de la columna, se agregaron 10 uL de la muestra en distintos pocillos hasta comprobar la ausencia de proteínas. En este punto se comenzó la elución de caspasa3Eg utilizando imidazol 500 mM que competirá por los sitios de unión al Níquel de la resina, liberando así la proteína de interés. Nuevamente se utilizó el reactivo Bradford como referencia para determinar el final de la elución y las alícuotas obtenidas fueron analizadas a través de geles de poliacrilamida al 15%; recurriendo una vez más al UByPA para la identificación de la proteína recombinante.

2.6.2) Análisis por espectrometría de masa

El informe recibido del UByPA verificó la presencia de caspasa3Eg, además de corroborar los datos de peso molecular y punto isoeléctrico.

2.6.3) Cromatografía de intercambio iónico

Como la cromatografía por afinidad no fue suficiente para obtener a caspasa3Eg completamente pura, se sumó otro paso de purificación. Se optó por realizar una cromatografía de intercambio iónico utilizando un intercambiador catiónico (SP) para la misma. Esta elección se realizó sabiendo que el punto isoeléctrico de caspasa3Eg es 8.54, y que al estar resuspendida en PBS pH 7, la proteína está cargada positivamente. Esto hará que se una a la matriz cargada negativamente, desplazando el contraión, y se podrá proceder a la elución alterando las condiciones de fuerza iónica.

Como precaución, previo a esta cromatografía se realizó un desalado de la muestra de modo de sacar el imidazol, utilizando una columna PD10 Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare) que permitió la rápida separación de moléculas de alto peso molecular, dejando eluir las sales y moléculas de bajo peso molecular sobrantes. De esta manera se obtuvo caspasa3Eg resuspendida en solución amortiguadora PBS1X, y se procedió a realizar la cromatografía de intercambio iónico.

Luego de equilibrar la columna con la solución amortiguadora PBS 1X, la muestra fue cargada y se realizó un lavado con la misma solución amortiguadora. Hasta este momento las proteínas con carga neta positiva se encontraban adheridas a la resina. La elución fue realizada aumentando progresivamente la concentración del contraión (Na^+) a modo de desplazar el equilibrio por el cambio generado en la fuerza iónica. De esta manera, se ve favorecida la unión del (Na^+) a la resina, y la liberación de la proteína. Para esto se realizaron lavados con solución amortiguadora PBS 1X-NaCl 50 mM, PBS 1X-NaCl 100 mM, PBS 1X-NaCl 200 mM, PBS 1X-NaCl 500 mM y PBS 1X-NaCl 1M. De cada eluido se realizaron medidas en el espectrofotómetro a $\lambda = 280$ nm para verificar la elución de la proteína. Los valores de absorbancia obtenidos reflejaron un bajo rendimiento por lo que la muestra fue concentrada mediante el uso de una columna Spin-X UF500 concentrator (LifeSciences) y vuelta a sembrar en un gel de poliacrilamida al 15%.

RESULTADOS

3.1) Obtención del ADNc que codifica para caspasa 3 de *Echinococcus granulosus*.

El ARN total extraído de protoescólex fue cuantificado a través del equipo NanoDrop (Thermo Scientific) obteniéndose una concentración de: $[ARN]_{total}=542.4$ ng/uL a una relación $A_{\lambda=260/\lambda=280}=1.93$. La integridad del ARN obtenido fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X cuya tinción fue realizada con GelRed (Biotinium). Se puede observar la banda correspondiente a la subunidad menor del ARN ribosomal 18S, mientras que el smear puede atribuirse a los ARN mensajeros por su variada longitud, y la banda de menor tamaño corresponde al ARN de transferencia (figura 13).

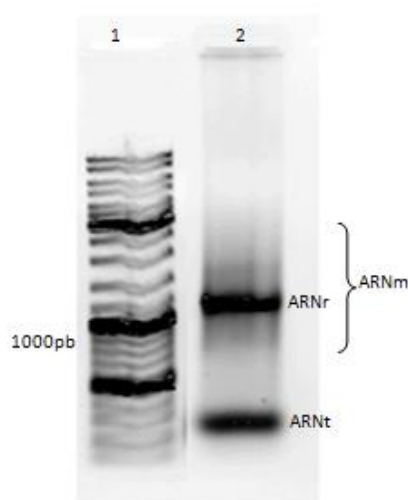


Figura 13. **ARN_{total} de *E. granulosus*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. [1] Marcador de tamaño GeneRuler 100 pb Fermentas, [2] ARN total de *E. granulosus*.

Luego del tratamiento del ARN con DNasa, el mismo fue nuevamente cuantificado a través del NanoDrop (Thermo Scientific) obteniéndose una concentración de $[ARN_{total}]=311.8$ ng/uL.

Seguido de la reacción de retrotranscripción, la evaluación del ADNc fue realizada mediante amplificación del gen *df1*, y posterior visualización de los productos por electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X. Se revela la presencia de una sola

banda del tamaño esperado (399pb) y la ausencia de la misma en el carril control. No se observa una banda por encima de los 500pb que pueda atribuirse a restos de ADN previo a la reacción de retrotranscripción como explica la sección 2.1.6 (figura 14).

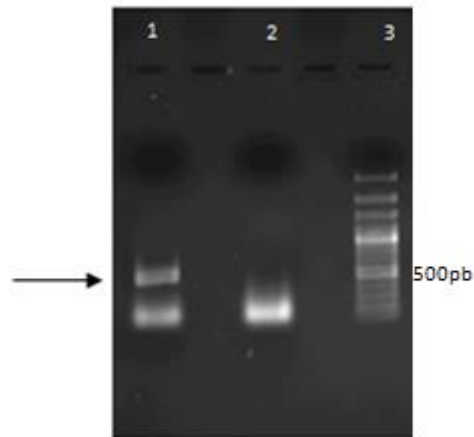


Figura 14. **Amplificación de *ADNcdf1***. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. [1] *ADNcdf1* se indica con la flecha; [2] control negativo; [3] Marcador de tamaño GeneRuler 100pb, Fermentas.

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X, también fue evaluada la PCR para caspasa3Eg con cebadores F4 y R1 (ver anexo 1). La banda esperada para el ADNc amplificado es de 886 pb, y se pudo verificar que estaba por debajo de la indicada por el marcador de tamaño para 1000pb. La tinción fue realizada con GelRed (Biotinium).

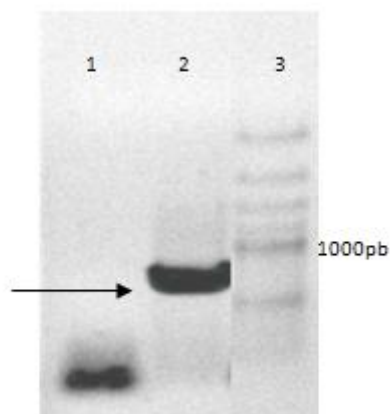


Figura 15. **Amplificación de caspasa3Eg**. Electroforesis en gel de agarosa 1%. [1] control negativo; [2] ADNc de caspasa3Eg señalado por la flecha; [3] Marcador de tamaño GeneRuler 100bp, Fermentas.

3.2) Clonado de caspasa3Eg en pGEM T Easy Vector (Promega).

Luego de la extracción de banda y su correspondiente purificación, el amplicón fue ligado al vector pGEM T Easy (Promega) y la ligación utilizada para transformar las células quimiocompetentes DH5 α de *E. coli*. Se realizó la selección de las colonias transformantes en base a la resistencia a la ampicilina y a la complementación en α ; las colonias blancas fueron picadas y pasadas a tubos de precultivo. El ADN plasmídico extraído de estos precultivos crecidos, fue digerido con la enzima EcoRI (Biolabs). Los productos de la digestión fueron visualizados a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X teñido con GelRed (Biotinium) que permitió seleccionar aquellos clones que al liberar el fragmento mostraron ser recombinantes.

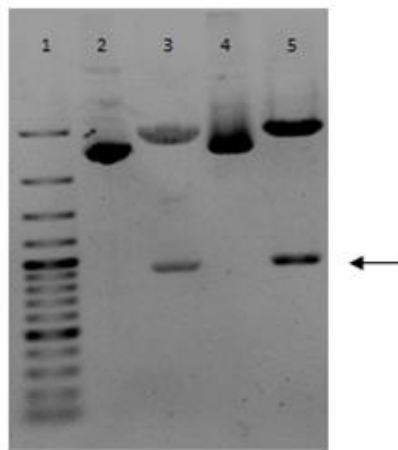


Figura 16. **Digestión de los plásmidos recombinantes.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. [1] Marcador de tamaño GeneRuler 100bp, Fermentas; [2] ADN plasmídico (a); [3] ADN plasmídico (a) digerido con EcoRI; [4] ADN plasmídico (b); [5] ADN plasmídico (b) digerido con EcoRI.

El ADN de los clones (a) y (b) en la figura 16, que liberaron el fragmento a la altura esperada, fue enviado a secuenciar para verificar la identidad del amplicón. El Informe recibido del servicio de secuenciación del IP, permitió analizar el cromatograma y extraer la secuencia del fragmento clonado que consta de 887pb (figura 17).

GGGACGACGTCACCGTGCCAGGCCCTCACCGACGCTTTCGAAAAGCGTTAAGCCGGCAGAAGTGACAACAGGAATC
 GGAAGTGGTGATGGACGAAGATACCTCAGCGAGATTGAGCTCTGCGACCCTGACCTTGGATACCCGCGGGTGGCG
 AACCCCTAACAAATCGTAGTAATCCGCGCGGTGTCTGCCTCCTCATCAACCAGCGCGATTTTGTATTGATCAGCCAAGACC
 GGGCAGGAGCGCCGTGACGGCACCGATGTCGATGCGGACAATATCGAACGCACTTTTATTTCGCTGTGGCTACGCT
 GTTAACCGCGCTACCAATCTCACGCTCCGAAAAATGGAGCTTCTTCTTGATGACGTGCGATCGCAGAACCACAGT
 AAGTACGACAGCTTCGCTTTCGCTCATCCTTAGCCACGGCGCTGAGGGGATTGTCTACGCCTCCGACGGGACCATC
 AACGTTGATCGTCTCATCGGATACTTCCGCTCCGATAGGTGCCCTACCCTCGCTGGCAAACCAAAAAATGTTCTTT
 ATTCAGGCCTGCCGAGGCTGCAAGTTCGATAAAGGTGTCACTCTCTCTACGGATGCTAGCTCGGACTCTGTGCTT
 ATCACAAGCTCCCCATCGAGGCCGACATCTTCGTCGCTAACTCAACCTTTCCCGTTACTACGCTTGGCGCAAC
 TCGCACGCAGGCAGTTGGTTTCATCCAGGAATTGTGCAAGGTGATAAAGGCGGCGCAGGAGTCAGGCCGGGCATCAC
 GACGTGGCCTCACTATTGACAGTGGTGGCGCGCAAAGTGGCACTGCTCTACGAGTCGAACACAGGCCAGAGCGAC
 TCCCACGGCAGTAAGCAGATGGTGAGCGTAAACTCCACACTTACCCGCAAGGCCTTCATCGT

Figura 17. **Secuencia del inserto clonado en pGEM T Easy Vector (Promega)**. Se muestran en rojo los cebadores utilizados y se subraya el residuo de Timina aportado por el vector de clonado.

A través del programa Gene Runner 3.05, la secuencia de ADN obtenida fue traducida, y con ella se buscaron secuencias homólogas disponibles en el GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool - standard protein (BLASTp). El resultado del BLASTp retornó una proteína anotada como caspasa 3 de *Echinococcus granulosus*, EgrG_000462900 (anteriormente: EgG_0010467200) lo que confirma la identidad del fragmento clonado.

Se realizó un alineamiento a través del programa ClustalW que permitió comparar las secuencias proteicas de caspasa3 entre los organismos que presentaban la mayor identidad de secuencia: *Homo sapiens* (BC016926.2), *Schistosoma mansoni* (FJ905905.1), *Gallus gallus* (NM_204725.1) y la de *E. granulosus* obtenida por nosotros. Los residuos del sitio activo conservados entre las distintas especies se remarcan con color rojo en la siguiente figura.

```

FJ905905.1      ECILINQRDFHPS-TNQSRRDGTDVDADRVERVFKSINYKVTRILNITKSVLHQTLLEAS
BC016926.2      LCIIINNKNFHKS-TGMTSRSGTDVDAANLRETFRNLYEVRNKNDLTREEIVELMRDVS
NM_204725.1     VCVIINNKNFHHRD-TGLSRSGTDADAASVREVFMKLGYKVKLNNDLSSRDIFKLLKNVS
E.granulosus   VCLLINQRDFD SAKTQERRDGTVDADNIIERTFIRCGYAVNRATNLTLRKMELLLDDVR

      *::**:::* . * . *.**.* ** :...* * * :: : : :.

FJ905905.1      QADHSSYDSFIFVMLSHGDNIIYANDGEVLTSYIMAFFRGDRCP SLIAKPKLFFFQACR
BC016926.2      KEDHSKRSSFVVCVLLSHGEEGIIIFGTNGPVDLKKITNFFRGDRCSRSLTGKPKLFFIIQACR
NM_204725.1     EEDHSKRSSFVVCVLLSHGDEGLFYGTDGPLELKVLTSLFRGDKCRSLAGKPKLFFIQACR
E.granulosus   SQNH SKY--FACVILSHGAEGIVYASDGTINVDRLIGYFRSDRCPTLAGKPKMFFIQACR

      . :** . * * :**** :.:.:.:* : . : **.* : * .****:.:****

FJ905905.1      GAAFDKGVSTMVTDAGEDLIVHKLPIEADILVAYSTVPGFFAWRNSSSGSWFIQELCNAL
BC016926.2      GTELD CGIETDS-GVDDDMACHKI PVEADFLYAYSTAPGYYSWRN SKDGSWFIQSLCAML
NM_204725.1     GTELD SGIEADS-GPDE-TVCQKI PVEADFLYAYSTAPGYYSWRNAAEGSWFIQSLCRML
E.granulosus   GCKFDKGVTLSTDASSD SVLITKLPIEADIFVANSTFPGYAWRN SHAGSWFIQELCKVI

      * :* * : . : * :****: * * * * : :****: *****.* * :

FJ905905.1      ESDMKNANHSDIMSLLTVVARVVAYQYRSNTGQIETDNMKQMTSTVSTLTRLFYINGLKS
BC016926.2      K--QYADKLEFMHILTRVNRKVATEFESFSFDATFHAKKQI PCIVSMLTKELYFYH---
NM_204725.1     K---EHARKLELMQILTRVNRVA-EYESCSTRQDFNAKKQI PCIVSMLTKEFYFPC---
E.granulosus   KAAQESGRHHDVASLT--VARKVALLYESNTGQSDSHGSKQMVSVNSTLTRKAFIV----

      : : : : : : * * * * :.* : . ** : . * * * : :

```

Figura 18. **Alineamiento de la secuencia aminoacídica de caspasa3Eg.** Se muestra la comparación de las secuencias de caspasa3 entre *E. granulosus* y los siguientes organismos: *Homo sapiens* (BC016926.2), *Schistosoma mansoni* (FJ905905.1) y *Gallus gallus* (NM_204725.1). (*) representa identidad total de los residuos. (:) indica posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas. (·) indica posiciones en las que se han realizado sustituciones menos conservativas.

Utilizando la herramienta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) se pudo obtener información teórica de los parámetros de esta proteína. Se obtuvieron datos acerca de su tamaño: 296 aminoácidos, su peso molecular de 32413.56Da, y su punto isoeléctrico teórico: 8.54. El programa también permite ver otras propiedades como los porcentajes de su composición aminoacídica, el tiempo de vida media estimado en distintos organismos y su índice de estabilidad, entre otras.

3.3) Modelado molecular de caspasa3Eg

Se realizó la predicción de la estructura proteica en 3D para caspasa3Eg por homología utilizando el software Bioinformatics Toolkit de Max Planck Institute for Developmental Biology (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). Esta herramienta brinda una lista de proteínas con homología de secuencia a la proteína problema, y permite la selección manual

de una de ellas para utilizar como templado del modelado. A través de una búsqueda en el Protein Data Bank, (www.rscb.org) la única cristalografía de caspasa3 de helmintos reportada hasta la fecha es la del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, con código PDB: 4M9R. La misma presenta una identidad de secuencia del 38,261% con la caspasa3Eg, por lo que está dentro de los parámetros permitidos para usarla como molde (se considera factible si la identidad de secuencia es >30%).

El modelo obtenido se muestra en la figura 19a, y fue analizado a través del programa PyMOL Molecular Graphics System. En él se puede observar una cola de 41 aminoácidos hacia el extremo N-terminal, que junto con los 39 aminoácidos faltantes en este dominio como consecuencia del clonaje desde un cebador interno (ver sección 2.1.7), conforman el prodominio de 10kDa que es eliminado durante la activación de la caspasa (ver sección 1.2). En la figura 18b, se puede visualizar el zimógeno luego de este primer clivaje en el residuo D requerido para la maduración de la caspasa, y se señalan también los residuos que conforman el pentapéptido conservado del sitio activo QACRG.

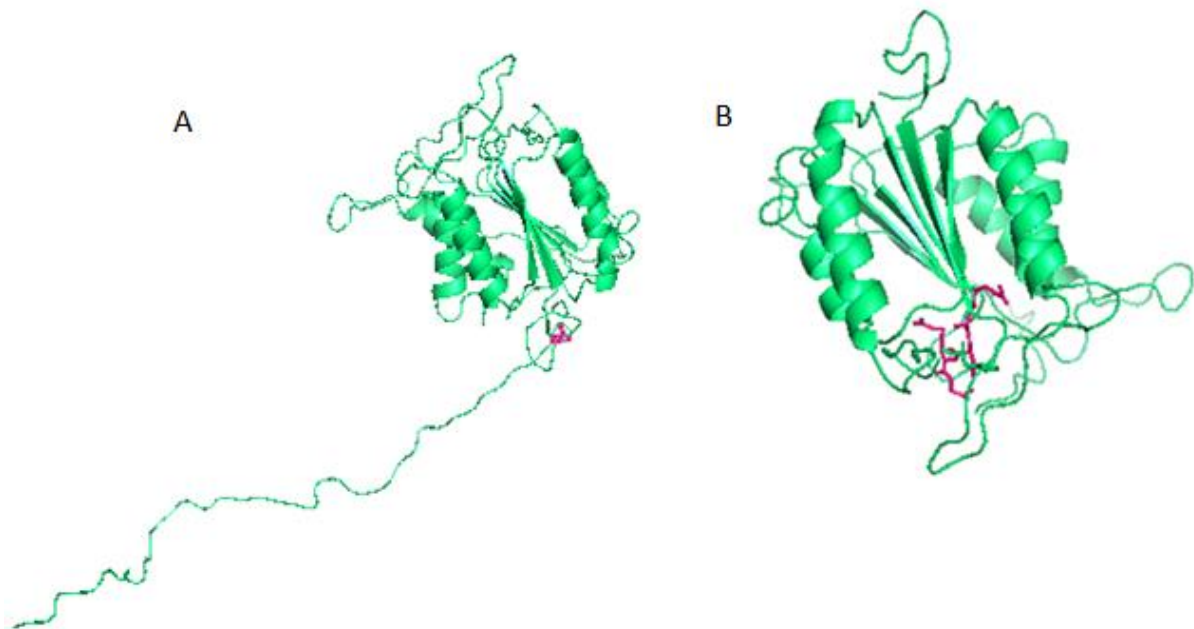


Figura 19. **Modelado molecular de caspasa3Eg.** A) Se puede ver la estructura secundaria en el modelo obtenido para el zimógeno procaspasa3 de *E. granulosus*. En rojo se señala el residuo D donde la misma es clivada. B) Se visualiza la estructura secundaria obtenida para caspasa3Eg. Se muestran en rojo los residuos conservados del sitio activo QACRG.

A su vez, este programa también permite la superposición de modelos estructurales en 3D, de manera que puede visualizarse qué tanto se parece nuestro modelo al de otra proteína homóloga. Para ello, le asigna un valor al parámetro de identidad denominado *Root Mean Square Deviation* (RMSD) que cuanto más chico sea, refleja una mayor similitud estructural entre ambos modelos. Para evaluar nuestro modelado se eligió la caspasa3 humana (PDB: 4QU0) cuyo porcentaje de identidad de secuencia con caspasa3Eg es del 40.41%, y el RMSD obtenido para esta superposición fue de = 0.806.

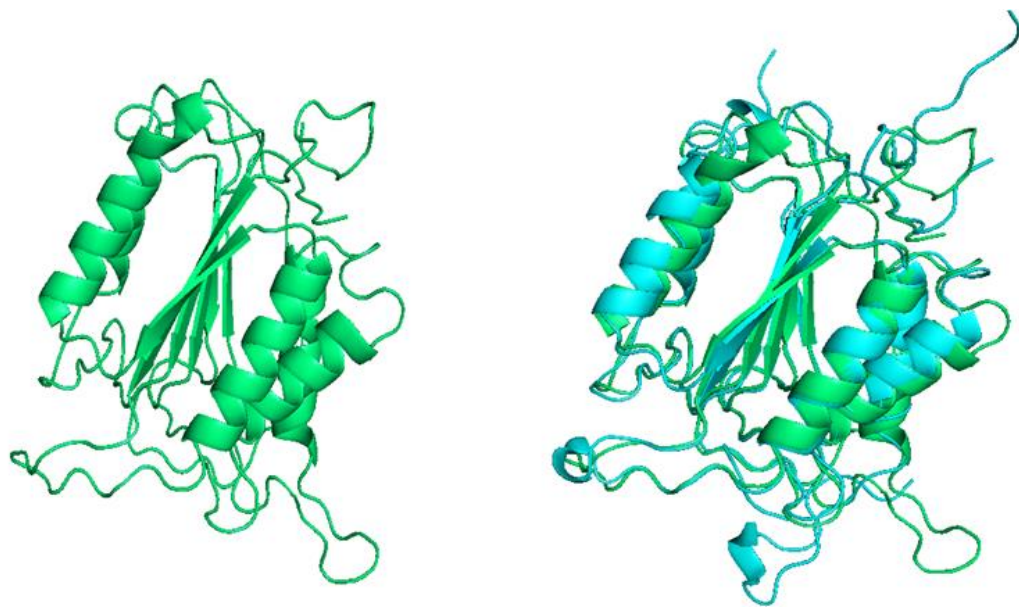


Figura 20. **Comparación del modelo estructural de caspasa3Eg con caspasa 3 humana.** Puede observarse a la izquierda el modelo obtenido para caspasa3Eg, y a la derecha el solapamiento de la misma (color verde) con caspasa3 humana (PDB: 4QU0, color celeste) obteniéndose un RMSD = 0.806

Si bien este modelo es una aproximación a la estructura real de la proteína, es interesante observar cómo el solapamiento en las estructuras alfa hélice y hojas beta es mucho más consistente que en aquellas zonas donde hay loops. Esto llevó a realizar el mismo modelado a través del servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), el cual permite visualizar de una manera más fácil los residuos que están involucrados en la estructura secundaria de la proteína. Los mismos se resaltan en la siguiente figura en amarillo si están implicados en estructuras hélice alfa y en celeste sin conforman hojas beta. Realizando la comparación con el alineamiento de la secuencia aminoacídica mostrado en la figura 19, puede verse que para algunas zonas (se subrayan en la figura 21) la conservación de los residuos explicaría la conservación de la estructura secundaria.

GTTSPCQASPTLSKSVKPAEVTTGIGSGDGRRYLSEIELCDPDLGYPRVANPNNRSNPRGVCLLINQRDFDS
 AKTGOERRDGTDVADANIERTFIRCGYAVNRRATNLTLRKMELLLDDVRSQNHSKYDSFACVILSHGAE GIVY
 ASDGTINVDRLIGYFRSDRCP TL LAGKPKMFFIQACRGCKFDKGVTLSTDASSDSVLI TKLP I EADIFVANST
 FPGYYAWRN SHAGS WFIQELCKVIKAAQESGRHHDVASLLTVVARKVALLYESNTGQSDSHGSKQMVSVNST
 LTRKAFIV

Figura 21. **Secuencia aminoacídica de caspasa3Eg**. Se muestra en rojo el pentapéptido que constituye el sitio activo y la histidina que también participa en la catálisis. Se resaltan en amarillo los residuos involucrados en hélices alfa y en celeste los que conforman las hojas beta.

3.4) Del vector de clonado al vector de expresión

La siguiente figura permite visualizar el esquema del vector de expresión elegido, con los sitios de restricción para las enzimas con las que se trabajó: NdeI y XhoI. Se tuvo en cuenta que estas enzimas permiten la conservación del sitio de unión al ribosoma (fundamental para la expresión de la proteína) y que la inserción del gen caspasa3Eg queda en fase con la expresión de la cola de histidinas en el C-terminal (fundamental para la purificación de la misma).



Figura 22. **Mapa de la región de clonado de pET22b(+) Vector (Novagen)**. Se pueden ver los sitios de restricción para las enzimas NdeI y XhoI, el sitio de unión al ribosoma (rbs) y la cola de histidinas (His-Tag). Extraído de www.novagen.com.

Con el fin de evaluar la amplificación por PCR del ADN plasmídico de pGEM T Easy-caspasa3Eg_{modificada} con los cebadores F5 y R5, que contienen en sus extremos los sitios de restricción para NdeI y XhoI, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución

amortiguadora TAE 1X. En el primer carril se observa el marcador de tamaño utilizado GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas). En el segundo carril se comprueba la efectividad de la amplificación para el gen caspasa3Eg, y en el tercero, el blanco de la corrida que asegura no tener contaminantes.

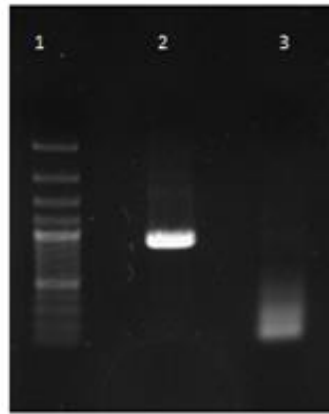


Figura 23. **PCR del ADN plasmídico pGEM T Easy-caspasa3Eg_{modificada} con cebadores F5 y R5.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. [1] Marcador de tamaño GeneRuler 100bp, Fermentas; [2] producto de la PCR del ADN plasmídico caspasa3Eg; [3] producto PCR del control negativo.

El amplicón obtenido fue subclonado en pGEM T Easy Vector (Promega) a modo de obtener un nuevo plásmido recombinante con la secuencia de caspasa3Eg modificada por la adición de los sitios de restricción para NdeI y XhoI en sus extremos: pGEMT Easy-caspasa3Eg_{modificada}. El mismo fue digerido con dichas enzimas (ver anexo 1), y posteriormente evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X, cuyo resultado se muestra en la siguiente figura.

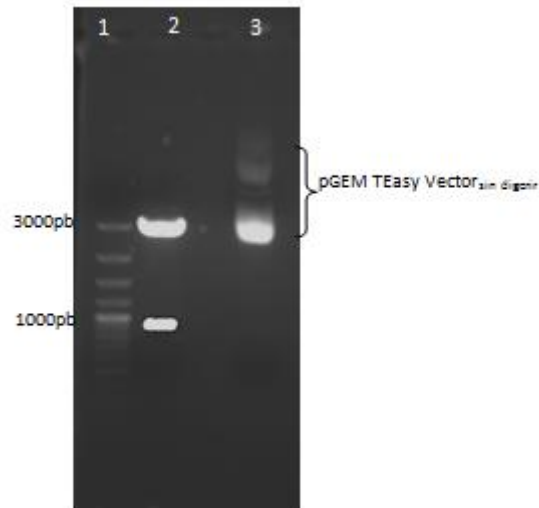


Figura 24. **Digestión del plásmido pGEMTEasy-caspasa3Eg_{modificada}.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. [1] Marcador de tamaño GeneRuler 100bp, Fermentas; [2] pGEM T Easy-caspasa3Eg_{modificada} digerida con NdeI y XhoI [3] Control pGEMTEasy-caspasa3Eg_{modificada} sin digerir.

Puede verse que el plásmido pGEMTEasy-caspasa3Eg_{modificada} digerido, liberó el inserto a la altura esperada para caspasa3Eg, banda que fue recortada y purificada para su posterior ligación a pET22b(+). Plásmido sin digerir pGEMTEasy-caspasa3Eg_{modificada} fue sembrado a modo de control pudiéndose distinguir sus distintas conformaciones circular y lineal.

Como se explicó en la sección metodología, se realizaron varias digestiones en paralelo del vector pET22b(+) con NdeI y XhoI, purificándose todas las bandas en la misma columna del Quick gel Extraction Kit #K210012 (Invitrogen). De este modo, se obtuvo un mejor rendimiento y concentración del vector en su conformación lineal y con extremos aptos para clonar el nuevo amplicón de caspasa3Eg. Las digestiones fueron visualizadas en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X sembradas en los carriles 2-6, y utilizando como referencia el marcador de tamaño GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) y plásmido sin digerir.

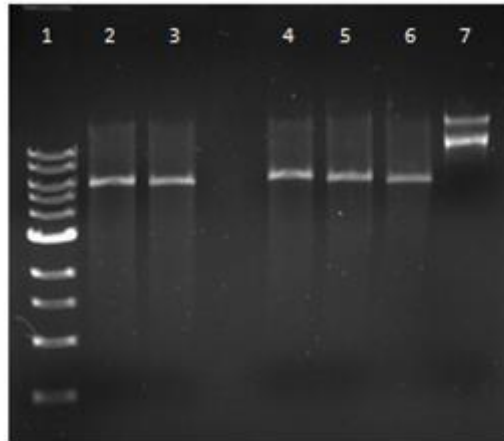


Figura 25. **Digestión del vector pET22b(+)** con **NdeI** y **XhoI**. Electroforesis en gel de agarosa 1%. [1] Marcador de tamaño 1kb DNA ladder (Fermentas); [2], [3], [4], [5] y [6] pET22b(+) digerido por NdeI y XhoI; [7] pET22b(+).

A través del equipo NanoDrop (Thermo Scientific), se realizó la cuantificación del ADN tanto del vector como del amplicón digeridos, llegándose a las siguientes concentraciones:

[pET22b(+)]_{lineal}: 21.4 ng/uL

[amplicón caspasa3Eg]: 62.3 ng/uL

Luego de la reacción de ligación, transformación de células DH5 α de *E. coli* y los precultivos correspondientes, se realizó la extracción del ADN plasmídico para analizar los clones obtenidos. Se realizó la digestión del ADN plasmídico con las enzimas NdeI y XhoI, la cual fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE 1X.

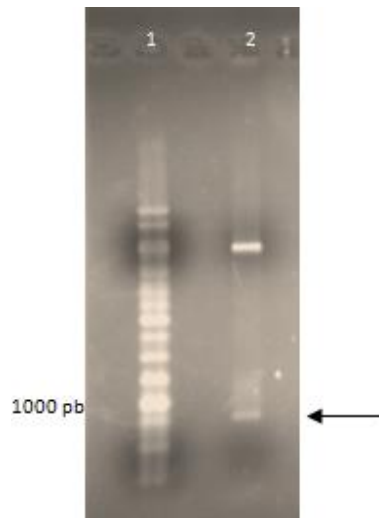


Figura 26. Digestión del ADNpET22b-caspasa3Eg por NdeI y XhoI. Electroforesis en gel de agarosa 1%. [1] Marcador de tamaño 1kb DNA ladder, Fermentas; [2] ADNpET22b-casp3Eg digerido por NdeI y XhoI. Se señala el inserto liberado por la digestión.

Al comprobar que se liberaba un inserto por debajo de la altura de 1000pb, el ADN plasmídico fue enviado al Servicio de Secuenciación del IP para su identificación. El informe recibido permitió confirmar que la banda clonada corresponde a caspasa3Eg con la siguiente secuencia nucleotídica de 949pb que se muestra a continuación.

ATACATATGGGACGACGTCACCGTGCCAGGCCTCACCGACGCTTTCGAAAAGCGTTAAGCCGGCAGAAGTGACA
ACAGGAATCGGAAGTGGTGATGGACGAAGATACCTCAGCGAGATTGAGCTCTGCGACCCTGACCTTGGATACCCG
CGGGTGGCGAACCCCTAACAAATCGTAGTAATCCGCGGGTGTCTGCCTCCTCATCAACCAGCGGATTTTGATTCA
GCCAAGACCGGGCAGGAGCGCCGTGACGGCACCGATGTCGATGCGGACAATATCGAACGCACCTTTTATTCGCTGT
GGCTACGCTGTTAACCGCGCTACCAATCTCACGCTCCGAAAAATGGAGCTTCTTCTTGATGACGTGCGATCGCAG
AACCACAGTAAGTACGACAGCTTCGCTTGCCTCATCCTTAGCCACGGCGCTGAGGGGATTGTCTACGCCTCCGAC
GGGACCATCAACGTTGATCGTCTCATCGGATACTTCCGCTCCGATAGGTGCCCTACCCTCGCTGGCAAACCAAAA
ATGTTCTTTATTCAGGCCTGCCGAGGCTGCAAGTTCGATAAAGGTGTCACCTCTCTACGGATGCTAGCTCGGAC
TCTGTGCTTATCACAAAGCTCCCCATCGAGGCCGACATCTTCGTCGCTAACTCAACCTTTCCCGTTACTACGCT
TGGCGCAACTCGCACGCAGGCAGTTGGTTCATCCAGGAATTGTGCAAGGTGATAAAGCGGCGCAGGAGTCAGGC
CGGCATCACGACGTGGCCTCACTATTGACAGTGGTGGCGCGCAAAGTGGCACTGCTCTACGAGTCGAACACAGGC
CAGAGCGACTCCACGGCAGTAAGCAGATGGTGAGCGTAAACTCCACACTTACCCGCAAGGCCTTCATCGTTCTC
GAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAAGCCCGAA

Figura 27. Secuencia nucleotídica para caspasa3Eg. En rojo los cebadores utilizados, en azul los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción y en verde la secuencia que codifica para His-tag.

La misma fue traducida en el programa www.expasy.org obteniéndose la siguiente secuencia aminoacídica, que también fue analizada en la base de datos de *Echinococcus granulosus* (www.genedb.org) identificándose como caspasa3. Tiene un total de 307 aminoácidos, de los cuales los primeros tres fueron aportados por el cebador F5, el cual incluye la metionina inicial. Los últimos seis residuos, se corresponden al tren de histidinas aportado por el vector pET22b(+) y los dos anteriores a estos, se corresponden con los codones para el sitio de restricción de XhoI agregados por el cebador R5. Finalmente, 296 aminoácidos son los que se corresponden con 100% de identidad a la caspasa3Eg de la base de datos.

IHMGTTSPCQASPTLSKSVKPAEVTTGIGSGDGRRYLSEIELCDPDLGYPRVANPNRNSNPRGVCLLINQRDFDS
 AKTGQERRDGTVDADNIERTFIRCGYAVNRATNLTLRKMELLLDDVRSQNHSKYDSFACVILSHGAEGIVYASD
 GTINVDRLIGYFRSDRCPTLAGKPKMFFIQACRGCKFDKGVTLSTDASSDSVLITKLP~~IEADIFVANST~~FPGYA
 WRNSHAGSWFIQELCKVIKAAQESGRHHDVASLLTVVARKVALLYESNTGQSDSHGSKQMVSVNSTLTRKAFIVL
EHHHHHH

Figura 28. **Secuencia aminoacídica obtenida de caspasa3Eg recombinante.** Se muestran en rojo los aminoácidos que codifican los cebadores F5 y R5, y en verde el His-Tag. Se subraya también la metionina inicial.

3.5) Inducción de la expresión de caspasa3Eg

La siguiente tabla esquematiza las condiciones de los distintos ensayos realizados en las células BL21(DE3)PLYsS de *E. coli*.

t (hrs) de inducción	T (°C) de inducción	[IPTG] (mM)	Medio de cultivo
4	37	0.5	LB
12	37	-	ZYM
ON	20	-	ZYM

Tabla 1. Condiciones de inducción de la expresión en células BL21(DE3)PLYsS de *E. coli*

Como se explicó en la sección metodología, las alícuotas F0, ET, Fsol y Fins de cada ensayo realizado en las células BL21(DE3)PLYsS de *E. coli*, fueron analizadas por SDS-PAGE no observándose inducción de la expresión en ninguna de estas condiciones.

En la inducción realizada en el medio autoinductor ZYM a 20°C ON, se observó una banda tenue en la fracción insoluble a la altura de 36 kb según el marcador de peso molecular utilizado, PageRuler prestained protein Ladder 10-180 kDa (Thermo). La misma fue recortada y mandada al servicio de espectrometría de masa de la Unidad de Bioquímica y Proteómica analítica del IP (UByPA) para su identificación. Mientras tanto, un WB fue realizado utilizando un anticuerpo α -histidinas con el fin de detectar la proteína recombinante, pero no se obtuvieron resultados concluyentes. El informe recibido confirmó que la banda correspondía a una proteína de *E. coli* reportada como “Chain A, Ompf Porin”.

Protein sequence coverage: 46%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 AEIYNKDGK VDLYGKAVGL HYFSKNGEN SYGGNGDMTY ARLGFKGETQ
51 INSDLTGYGQ WEYNFQGNNS EGADAQTGNK TRLAFAGLKY ADVGSPDYGR
101 NYGVVYDALP EFGSDTAYSD DFFVGRVGGV ATYRNSNFFG LVDGLNFAVQ
151 YLGKNERDTA RRRENGDGVGG SISYEYEGFG IVGAYGAADR TNLQEAQPLG
201 NGKKAQWAT GLKYDANNIY LAANYGETRN ATPITNKPTN TSGFANKTQD
251 VLLVAQYQFD FGLRPSIAYT KSKAKDVEGI GDVDLVNYFE VGATYYFNKN
301 MSTYVDYIIN QIDSDNKLGV GSDDIVAVGI VYQF
  
```

Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)
36	“Chain A, Ompf Porin” de <i>Escherichia coli</i> .	36

Figura 29. **Resumen del resultado otorgado por el UByPA.** A modo ilustrativo, se muestra la identificación por mapeo peptídico luego de la digestión por tripsina.

En base a los resultados obtenidos, fue necesario estudiar más a fondo el sistema de expresión que estaba siendo utilizado a través de un análisis del uso raro de codones. A través del programa *Graphical Codon Usage Analyzer*, se analizó la secuencia para caspasa3Eg en *E. coli*, encontrándose 1 solo codón de uso raro, que codifica para la Leucina256. Luego de transformar la cepa Rosetta de *E. coli* con el plásmido recombinante pET22b(+)-caspasa3Eg, dado a que la cepa aporta ARNt para el codón CUA, codificante para leucina, se realizó la inducción de la expresión en el medio de cultivo TB (ver sección 2.5.4). Las alícuotas obtenidas F0, ET, Fsol y Fins en este ensayo, fueron analizadas por SDS-PAGE al 15%. Como lo muestra la siguiente figura, no resultó posible discriminar si hubo inducción entre las bandas obtenidas, por lo que se procedió a la purificación de cada fracción.

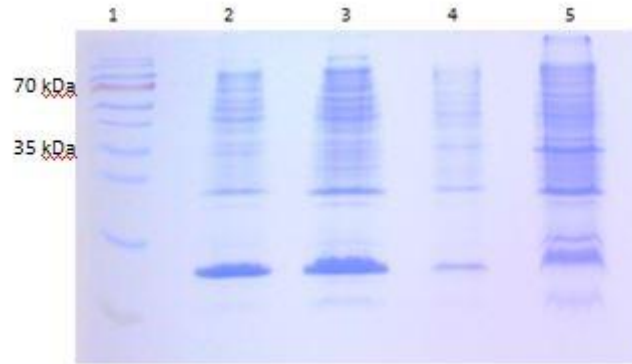


Figura 30. **Análisis de las alícuotas obtenidas luego del procesamiento del cultivo de la cepa Rosetta de *E. coli* transformada con pET22b-caspasa3Eg.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. [1] Marcador de tamaño PageRuler, ThermoFisher; [2] fracción sin inducir; [3] extracto total inducido; [4] fracción soluble [5] fracción insoluble.

3.6) Purificación de caspasa3Eg

Partiendo de la base de que la proteína caspasa3Eg fue construída utilizando un vector que le aportaría una cola de histidinas, se realizó la purificación de la misma a través de una cromatografía de afinidad utilizando una resina cargada con Níquel. Luego de realizar la elución de la proteína con imidazol 500mM tal como se describe en metodología, las fracciones fueron visualizadas mediante una SDS-PAGE al 15%. En la figura siguiente se observa la fracción soluble purificada, cuyo análisis por el servicio de espectrometría de masa del UByPA confirmó la identidad de caspasa3Eg con una cobertura del 67%.

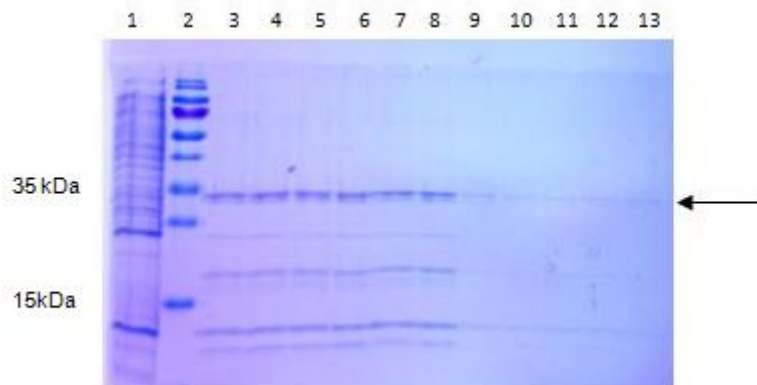


Figura 31. **Cromatografía de afinidad para Fsol.** SDS-PAGE al 15%. [1] Percolado de la fracción soluble; [2] Marcador de tamaño PageRuler ThermoFisher; [3 - 13] alícuotas de la elución de la cromatografía de afinidad para la fracción soluble con imidazol 500mM. La flecha indica las bandas presuntivas de caspasa3Eg con una masa molecular por debajo de 35 kDa.

El informe del UByPA recibido, corroboró de forma más exacta los datos previamente obtenidos por el análisis del servidor ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) en cuanto al peso molecular de la proteína recombinante: 32.39 kDa y de su punto isoeléctrico 8,53.

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

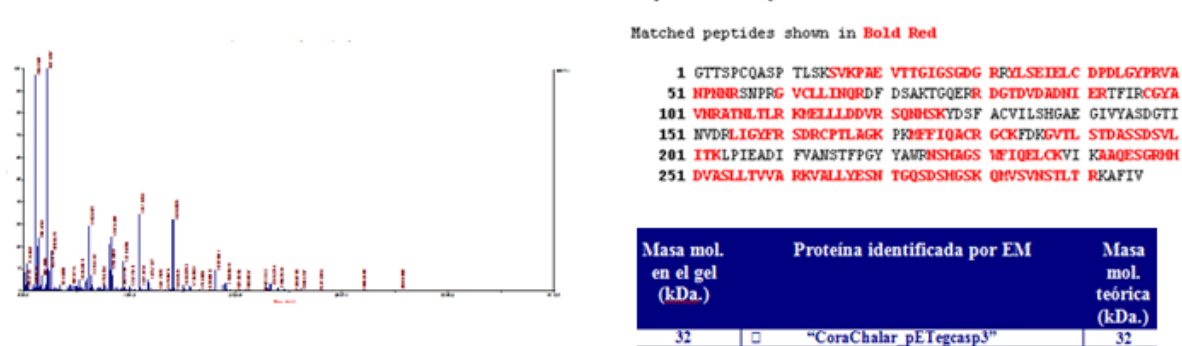


Figura 32. Sección del informe entregado por el UByPA. A modo ilustrativo se muestra el espectro de masa obtenido en modo reflector positivo, el mapeo peptídico luego de la digestión con tripsina con una cobertura del 67% y el resumen del análisis confirmando la identidad de caspasa3Eg.

Como se explica en materiales y métodos, la muestra fue posteriormente purificada por cromatografía de intercambio iónico. Luego de concentrarla mediante la columna Spin-X UF500 concentrator (LifeSciences), fue sembrada en un gel de poliacrilamida al 15%. Sin embargo, puede observarse que la purificación aún deja algunos contaminantes.

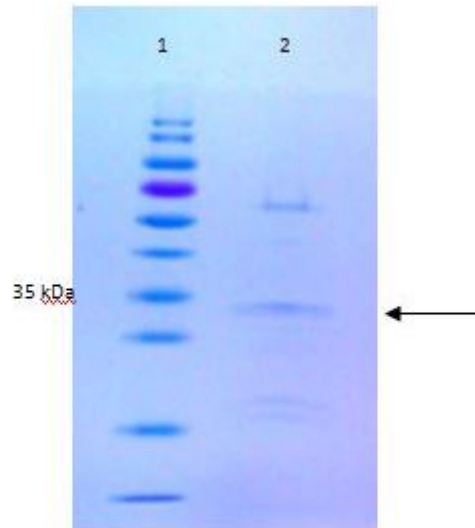


Figura 33. **Cromatografía de intercambio iónico para Fsol.** SDS-PAGE al 15%. [1] Marcador de tamaño Protein ladder, ThermoFisher; [2] eluido de la columna de intercambio iónico. La flecha indica capasa3Eg.

Métodos de purificación aún más estrictos fueron planteados para futuros ensayos y se discuten a continuación.

4.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El propósito del presente trabajo fue estudiar el gen caspasa3 del parásito *E. granulosus*, como etapa inicial para futuras investigaciones en el proceso apoptótico de este organismo. Para ello se logró realizar la purificación del ARN proveniente de protoescólex de *E. granulosus*, permitiendo obtener el material de partida necesario para desarrollar los objetivos planteados. La obtención del ADNc para caspasa3Eg fue alcanzada con éxito a partir de cebadores complementarios a una región interna del gen, lo que atribuimos a un mejor posicionamiento de la enzima utilizada en ese entorno de la secuencia. La elección de la *Taq polimerase* (Invitrogen) fue realizada no solo por ser una enzima termoestable adecuada para la PCR, sino que también porque genera ADNs con una adenina terminal no apareada en el extremo 3', lo cual resultó ventajoso al facilitar su ligación en el vector pGEM T Easy (Promega).

En cuanto al clonaje del gen caspasa3Eg en el vector pET22b(+) (Novagen), fue posible verificar su identidad y que el inserto se encontraba en el marco de lectura correcto para su posterior traducción, en base al resultado otorgado por el Servicio de Secuenciación del IP. A través de un estudio bioinformático de la secuencia nucleotídica traducida se pudo evaluar mediante un alineamiento, la homología de caspasa3 entre distintas especies. La similitud entre las secuencias junto con la predicción de la estructura secundaria revelan los aspectos evolutivos de la señalización apoptótica, presumiblemente, la conservación de la secuencia aminoacídica conduce a la conservación de la función. Esto se manifiesta para caspasa3 principalmente en la conservación del pentapéptido que conforma el sitio activo de la enzima, y para la familia de caspasas en general, en la presencia de al menos seis alfa hélices que componen los dominios CARD y DED (Hoffman et al., 1997). La visualización del modelo obtenido en 3D, permite apreciar la estructura secundaria de la proteína dando una pauta de cómo se disponen en el espacio las hélices alfa y las hojas beta. Si bien es una aproximación a la estructura real de la proteína, su comparación con la estructura de otra caspasa ya cristalizada resultó en un muy buen alineamiento estructural, lo que deja suponer que nuestro modelo no se aleja tanto de la realidad.

Si bien aún no existe un protocolo universal para llegar a la expresión y solubilidad óptimas de una proteína recombinante, la experiencia ha demostrado que mediante la variación de las condiciones del experimento, se logran importantes cambios en los resultados. A modo de ensayo y error, los primeros parámetros que se deben evaluar son el medio de cultivo, temperatura de/y post-inducción, y el organismo huésped utilizados (Papaneophytou et al., 2013). En base a esto fue que se realizaron diversas pruebas de inducción en la cepa BL21(DE3)PLYs de *E. coli*, pero como se describió previamente, ninguna de esas condiciones resultó eficaz en dicha cepa.

Como la cepa BL21(DE3)PLYs de *E. coli* es deficiente en las proteasas que poseen la triada catalítica *Ser-Asp-His*: OmpT y Lon, (Sorensen et al., 2004) y además, en el protocolo de trabajo se incluía el inhibidor de proteasas PMSF, sería poco probable que la proteína expresada pudiera degradarse. Sin embargo, algunos autores afirman que cuando caspasa3 es expresada en *E. coli* la misma sufre autoproteólisis (Stennicke et al., 1994; Kang et al., 2008). En sus trabajos publicados, se pueden observar geles de poliacrilamida con dos bandas asociadas a las subunidades p10 y p20, confirmando posteriormente el autoprocesamiento de las caspasas. En nuestros resultados, como puede observarse en la figura 30, hay una banda a la altura de 32kDa correspondiente a caspasa3Eg íntegra, pero también se observan dos bandas de menor intensidad, que por la altura en que se encuentran, podrían atribuirse a las dos subunidades de caspasa3 procesada (12kDa y 17 kDa). Esto implica que existe la probabilidad de que cierta cantidad de proteína expresada esté siendo autoprocesada, lo que debería confirmarse mediante un análisis de las bandas por espectrometría de masa, pudiendo ser la causa de los bajos niveles de proteína recombinante recuperada.

Por otra parte, el 80% de las proteínas cuya elucidación estructural está publicada en el PDB (www.rcsb.org) fueron preparadas en cepas de *E. coli*. En su mayoría, han sido expresadas en base al sistema conformado por el vector pET - T7 (Novagen), el cual provee los factores esenciales para lograr la expresión de proteínas recombinantes (Sorensen et al., 2004). Desde el punto de vista del vector, este plásmido incluye un gen de resistencia a antibiótico, es de alto número de copias, y contiene el sitio de unión al ribosoma con la secuencia Shine-Dalgarno corriente arriba del sitio de policlonado. Tiene un fuerte promotor transcripcional

inducible, capaz de producir la proteína de interés entre un 10 y 30 % en exceso frente al total de las proteínas celulares y minimizar la transcripción basal. Además, posee terminadores de la transcripción unos pares de bases corriente arriba de f1, que impiden la transcripción a través del origen de replicación (ver figura 10). Esto refuerza la estabilidad del plásmido, a la vez que previene la expresión a partir de otros promotores irrelevantes.

Sin embargo, existen otros factores que escapan a la efectividad general de este sistema, que tienen que ver con el transcripto del gen de interés, y con la compatibilidad de la secuencia a ser expresada y el surtido de ARNt que ofrece la cepa de *E. coli* que está siendo utilizada. Por un lado, la rápida degradación del ARNm puede comprometer la producción de la proteína. Esto llevó al desarrollo de algunas estrategias que implican la adición de secuencias específicas en regiones no codificantes del ARNm que potencien la formación de bucles en sus extremos aumentando la estabilidad del transcripto. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de codones en la secuencia de interés que son de uso raro por la cepa elegida, afectan la eficiencia de la traducción (Hanning et al., 1998). Esto se debe a que el ribosoma se frena por falta de ARNs de transferencia provocando errores de sustitución aminoacídica, o enlentece la reacción, o incluso termina prematuramente la síntesis proteica (Sorensen et al., 2004).

En este sentido, fue realizado el análisis del uso de codones raros a través del servidor Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcu.schoedl.de/>), detectándose la presencia de un codón “CTA” en la posición 256 de nuestra secuencia que codifica para leucina y cuya frecuencia de uso por la cepa elegida es menor al 20%. Por esta razón, fue transformada con el vector de expresión recombinante pET22b(+)-caspasa3Eg, la cepa Rosetta de *E. coli*, sabiendo que esta aporta mediante un plásmido, ARNs de transferencia para algunos codones, entre ellos, el codificante para la leucina. Sin embargo, debemos resaltar que si bien aún no han sido halladas las condiciones óptimas de expresión, caspasa3Eg fue obtenida y en estado soluble.

El Servicio de Optimización de GenScript (genscript.com/codon_opt_pr.html), ofrece un análisis más exigente del uso de codones raros a través del algoritmo de optimización OptimumGene™, el cual tiene en cuenta factores críticos en la síntesis de proteínas como

son: la adaptabilidad al uso de codones del huésped, el contenido GC, la formación de posibles estructuras secundarias del ARNm y su estabilidad, y elementos en cis reguladores de la transcripción y la traducción. Mediante dicho servicio pudimos obtener información sobre el índice de adaptación de codones: La adaptabilidad relativa de un codón, es la relación entre la frecuencia observada de ese codón y la frecuencia del codón más abundante para el mismo aminoácido (Behura S.K., 2013). El *Codon Adaptation Index* (CAI) es la técnica más usada para analizar el sesgo en el uso de codones y se define como la medida geométrica de los valores de la adaptabilidad relativa de codones individuales, a lo largo de la secuencia del gen medido en codones (Jansesn et al., 2003; Sharp et al, 1987). La posibilidad de tener un alto nivel de expresión de proteínas está correlacionada con el valor de CAI: un CAI de 1.0 es considerado ideal, mientras que mayor a 0.8 se considera bueno para expresar en ese organismo; cuanto más bajo el número, es más probable que sea baja la expresión. La siguiente gráfica muestra que el CAI para caspasa3Eg expresada en *E. coli* es de 0.65, lo que podría estar explicando los bajos niveles de expresión obtenidos.

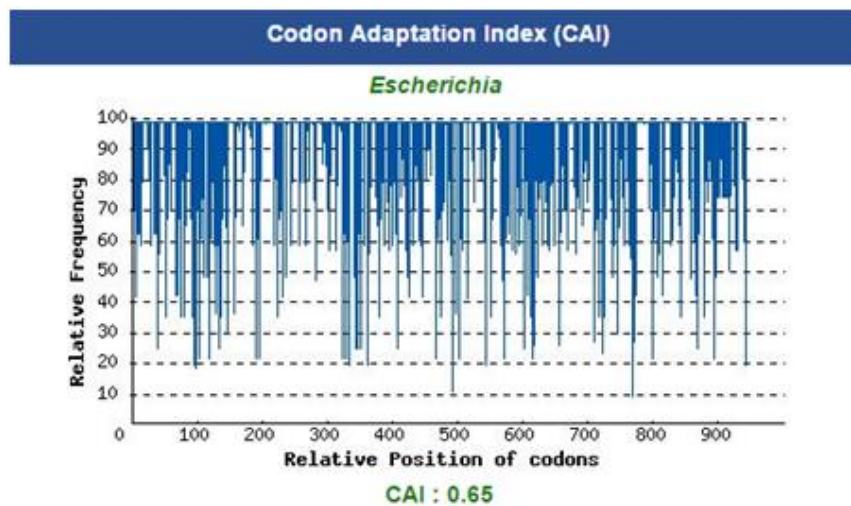


Figura 34. Distribución de la frecuencia del uso de codones a lo largo de la secuencia del gen caspasa3Eg en *E. coli*.

Este algoritmo también realiza una distribución porcentual de los codones requeridos por la secuencia a ser expresada, en *grupos de codones de calidad adecuada* asignando el valor 100 para el codón usado con más frecuencia para un aminoácido dado por la cepa huésped, mientras que considera *codones de baja frecuencia* si su valor es menor a 30%. El informe

obtenido para la expresión de pET22b(+)-caspasa3Eg en *E. coli*, muestra que hay un 9% de los codones requeridos por caspasa3Eg que son de baja frecuencia según el valor umbral establecido, que si bien parece un número pequeño en el conjunto de los factores a tener en cuenta sigue siendo una desventaja.

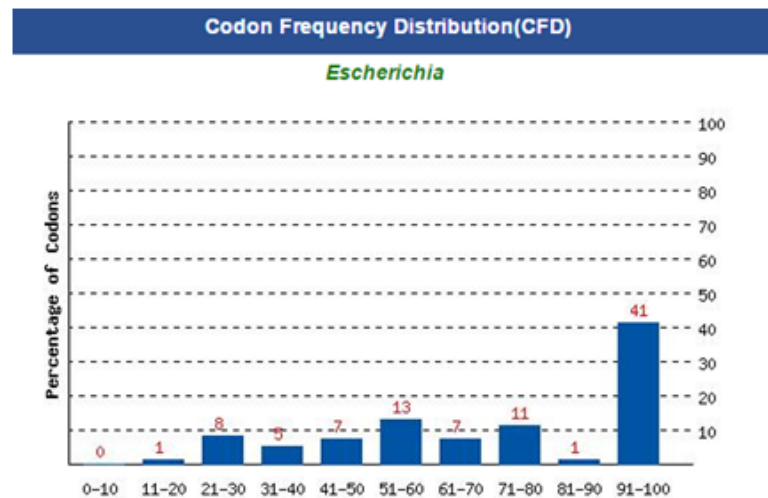


Figura 35. Distribución porcentual de frecuencia del uso de codones de la secuencia nucleotídica caspasa3Eg. Se asigna el valor 100 al codón con la frecuencia de uso más alta para un aminoácido dado en el organismo de expresión deseado.

Por otra parte, la estabilidad del ARNm está vinculada al porcentaje de guaninas y citocinas presentes en la secuencia, ya que estas bases establecen tres enlaces de hidrógeno entre ellas, lo que ofrece una resistencia mayor frente a una posible ruptura. La siguiente gráfica representa el análisis del contenido GC en la secuencia para caspasa3Eg en una distribución porcentual. Se considera que cualquier pico fuera del margen 30-70% puede afectar tanto la transcripción como la traducción, pero para este caso 55,7% es un buen promedio de contenido GC, por lo que en este aspecto la secuencia sería propicia para expresarse en el sistema heterólogo.

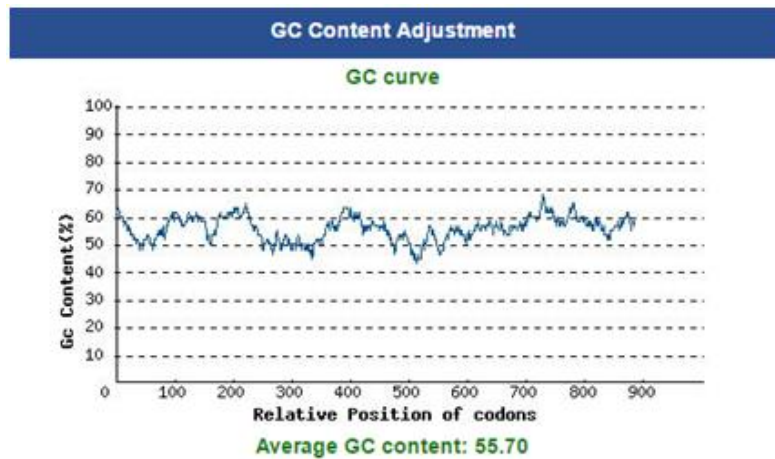


Figura 36. Distribución porcentual del contenido GC de la secuencia nucleotídica de caspasa3Eg.

Por lo tanto, las razones que explicarían el bajo rendimiento obtenido para caspasa3Eg, estarían perfiladas a la influencia del uso de codones por la cepa elegida como hospedero. Para mejorar esto, se podría recurrir al servicio de optimización de secuencia brindado también por GenScript, que no solo mejoraría los parámetros recién analizados, sino que también optimizaría las condiciones para evitar la formación de estructura secundaria del ARNm así como del plegamiento proteico.

En cuanto a la purificación de caspasa3Eg, la cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado (IMAC), suele presentarse como una técnica sencilla y eficiente para la purificación de proteínas. La columna elegida y empaquetada con una resina de Níquel-ácido nitrilotriacético, permitió la interacción entre el Níquel y la cola de histidinas de la caspasa3Eg. Si bien la cromatografía fue eficiente y a través de una SDS-PAGE se pudo ver la banda correspondiente a caspasa3Eg, la elución mostró al menos cuatro proteínas más aunque en menor cantidad, que se adhirieron a la resina. Estas bandas será conveniente analizarlas por espectrometría de masa teniendo en cuenta que dos de ellas por su masa molecular, podrían corresponder a caspasa3Eg procesada. De cualquier forma, fue replanteado el sistema de purificación, encontrándose un trabajo de Kang H. J. et al., 2008, en donde obtienen un mejor rendimiento de la purificación de caspasa3 utilizando resinas de cobalto. En el laboratorio esperamos adquirir este tipo de resina a la brevedad y poder realizar este ensayo con el fin de mejorar nuestros resultados.

De igual manera, el nivel de purificación alcanzado, permite proceder hacia la obtención del suero α -caspasa3Eg, ya que el mismo podrá ser depletado de proteínas de *E. coli* por incubación con un extracto, logrando así una mayor especificidad en los futuros estudios de inmunolocalización. Contar con un anticuerpo de este tipo, permitirá estudiar la expresión espacio-temporal de caspasa3 en los diferentes estadios del parásito. Esto tendrá relevancia biomédica en base a la correlación negativa que ha sido hallada entre la apoptosis y la fertilidad de los quistes.

La presencia de parásitos o la deposición de derivados parasitarios en los tejidos durante un largo tiempo, es un factor crucial en la carcinogénesis inducida por helmintos debido a la inflamación crónica que generan. Células inflamatorias como macrófagos o eosinófilos, generan radicales libres y especies reactivas del nitrógeno en respuesta a infección parasitaria. Estos productos pueden oxidar, dañar e iniciar mutaciones en el ADN, que conducen a una inestabilidad del genoma pudiendo resultar en una transformación maligna de la célula. El daño repetitivo en el tejido causado por la presencia continua del parásito, o de sus huevos, o de sus productos secretados, conducen a hiperplasia restaurativa del tejido. Esto podría promover la propagación de células en las que ADN ha sido dañado, por lo que es cuestión de tiempo o de un nuevo evento genotóxico el inicio del desarrollo de un tumor (Vennervald et al., 2009).

Se cree que un 25% de los casos de cáncer a nivel mundial, tienen su origen en infecciones recurrentes u otras condiciones de inflamación crónica. Infecciones crónicas con virus, bacterias y parásitos, contribuyen al 17,8% de las causas del cáncer, y se estima que habría un 26.3% menos de casos de cáncer en países en desarrollo, si estas infecciones fueran prevenidas o tratadas (Vennervald et al., 2009). Aunque el cáncer como consecuencia de infección crónica con helmintos es una proporción relativamente pequeña dentro de estos parámetros, no deja de ser un grupo importante debido a que el número de personas expuestas o infectadas a nivel mundial es muy alto.

Sin embargo, resulta controversial que en los últimos años, diferentes grupos de investigación reportaron de manera independiente una correlación negativa entre algunas infecciones parasitarias y una transformación celular maligna. Gran parte de estos estudios

se basan en que muchos helmintos secretan glicoconjugados cruciales para el establecimiento del parásito en el hospedero. Presumiblemente, estas secreciones exponen antígenos similares a los que podrían encontrarse en células tumorales, por lo que se podría dar una respuesta inmune de reactividad cruzada efectiva contra las células cancerígenas. De esta manera, la respuesta inmunitaria contra la infección del parásito resultaría en un efecto protector frente a una célula cancerígena (Osinaga, 2007).

En estudios de pacientes con hidatidosis, enfermedad causada por la infección con el parásito *E. granulosus*, se observó que la prevalencia del cáncer era significativamente más baja que en individuos control. Evidencias de una similitud antigénica entre este parásito y algunos tipos de tumores explicaron este resultado, mostrando antígenos de *E. granulosus* que participaban en la inducción de una respuesta inmune de reactividad cruzada que sería efectiva contra el crecimiento del cáncer (Berriel et al., 2013; Akgul et al., 2003). Al igual que todos los platelmintos de la clase cestoda, *E. granulosus* es un parásito cuyo ciclo biológico presenta un estadio larvario y un estadio adulto, y en ambos han sido detectados este tipo de antígenos (Osinaga, 2007). En este sentido, se abre una nueva perspectiva de investigación, para la cual conocer los fenómenos implicados en el desarrollo biológico del parásito resulta fundamental.

5.CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

De acuerdo a los ensayos realizados y los resultados obtenidos, puede concluirse que se logró la identificación, clonado y expresión del gen que codifica para caspasa3 de *E. granulosus*. Queda de manifiesto la necesidad de profundizar en el conocimiento de las condiciones óptimas para la expresión de la proteína caspasa3Eg y verlo plasmado en la obtención del anticuerpo que permitirá realizar los estudios de inmunolocalización. De esta manera será posible conocer el modo en que caspasa3Eg acompaña los fenómenos apoptóticos que sufre la célula asociada al corpúsculo calcáreo, puntapié disparador de esta investigación. Se abre entonces un extenso panorama de trabajo a corto y largo plazo, en el cual destaco dos áreas a desarrollar en el laboratorio próximamente.

Por un lado, es de nuestro interés medir la actividad de la enzima recombinante caspasa3Eg. Para esto contamos con dos ventajas, la primera es que la enzima fue obtenida en estado soluble y la segunda es que contamos con un kit comercial de aplicación relativamente sencilla. Un trabajo similar a este, fue realizado por Paredes et al., y publicado en el 2007, en el cual muestras de la membrana germinativa de quistes hidáticos fueron procesadas y estudiadas con el kit Caspase 3 Assay Kit (Promega). Este, contiene un inhibidor de caspasa 3 Z-VADFMK (Z-Val-Ala-Asp-fluoromethyl- ketone) y un sustrato en solución amortiguadora N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA) 10mM, que al ser clivado por caspasa3 produce un color amarillo que puede ser medido a $\lambda = 405\text{nm}$. Luego de la incubación de la muestra con y sin el inhibidor de caspasa 3, las diferencias en la absorbancia permitieron medir la actividad de caspasa3 y expresarla como actividad específica en relación a picomoles pNA liberados/mg/h (Paredes et al., 2007). En base a este trabajo, se pretende realizar también medidas de actividad enzimática de caspasa3Eg en protoescólex de *E. granulosus*, a modo de estudiar su expresión en esa fase del estadio larvario.

Por otro lado, para la obtención de suero reactivo contra la proteína recombinante previamente purificada, se recurrirá al servicio de la Unidad de Biotecnología del Polo Tecnológico de Pando (UdelaR). El anticuerpo obtenido será evaluado por Western blot con extractos proteicos totales de protoescólex, y con la proteína recombinante que le dio

origen. Asimismo, se realizarán estudios histológicos por inmunofluorescencia, que permitan visualizar la distribución de caspasa 3, prestando especial atención en el estado larvario a la célula asociada al CC de *E. granulosus* durante la maduración del protoscólex.

Para los estudios de inmunolocalización, el material parasitario será fijado en PAF al 4% y se incluirá en paraplast. Se obtendrán secciones de 5-7 μm que serán deparafinadas y rehidratadas en etanol 100 a 25%. Posteriormente, serán tratadas con solución de bloqueo [0.1% Tween 20, 5% (w/v) BSA, 1% suero de caballo inactivado por calor, 2% (w/v) glicina en PBS] durante 45 minutos e incubadas overnight a 4°C con el suero anti-caspasa3 diluido 1/500 en solución de bloqueo. Luego las secciones serán lavadas en PBS e incubadas con anticuerpo de conejo conjugado a fosfatasa alcalina durante 1,5 hrs a temperatura ambiente. Luego serán nuevamente lavadas con PBS y se realizará el revelado utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) y nitro-blue-tetrazolium (NBT) como sustratos. Las secciones serán examinadas mediante microscopía fotónica y las imágenes serán capturadas no más de 24 horas luego de la tinción. El control se hará con suero preinmune en las mismas condiciones.

En definitiva, en este trabajo se han generado herramientas que permitirán continuar con esta línea de investigación. Si bien hasta el momento no está descrito el proceso de muerte celular programada en *E. granulosus*, los datos de sus secuencias genómicas que revelan la presencia del gen que codifica para caspasa3, que ahora sabemos que se expresa en el estadio de protoscólex, y del gen para caspasa 8 (www.genedb.org), nos sugiere la existencia de una vía apoptótica, que de acuerdo a lo planteado en la Introducción correspondería a una vía de tipo extrínseca con la caspasa 8 como iniciadora y la caspasa 3 como ejecutora del proceso. Se espera que la continuación de estos estudios consoliden esta hipótesis enmarcada en la conservación evolutiva de la apoptosis en los metazoarios.

6.BIBLIOGRAFÍA

- **Akgul H., Tez M., Unal A. E., Keskek M., Sayek I. and Ozcelik T.** (2003). Echinococcus against cancer: why not?. *Cancer*, 98, 1999–2000
- **Behura S.K. and Severson D.W.** (2013). Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. *Biological Reviews*, 88, 49-61
- **Bender T., and Martinou J. C.** (2013). Where Killers Meet—Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane during Apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a011106
- **Berriel E., Russo S., Monin L., Festari M. F., Berois N., Fernández G., Freire and Osinaga E.** (2013). Antitumor activity of human hydatid cyst fluid in a murine model of colon cáncer. *The Scientific World Journal*, doi: 10.1155/2013/230176
- **Breitschopf K., Zeiher A. M. and Dimmeler S.** (2000). Ubiquitin-mediated Degradation of the Proapoptotic Active Form of Bid - A functional consequence on apoptosis induction. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, (28) 21648–21652
- **Cascales Angosto M.**(2003). Bases moleculares de la apoptosis, *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, 69, 37-55
- **Chalar C.** (2010). Biología del corpúsculo calcáreo en cestodos: una aproximación bioquímica, molecular y celular. Tesis de Doctorado, PEDECIBA
- **Chalar C., Martínez C., Brauer M., Ehrlich R., Marín M.** (2016). *eghb2*, a homeobox gene involved in the maturation of calcified structures in *Echinococcus granulosus*. *Gene Reports* (3), 39-46
- **Chomczynski P., Sacchi N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1), 156-9
- **Cohen G. M.,** (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1–16
- **Degterev A., and Yua J.** (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Molecular Cell Biology*, 9
- **Elliot J. M., Rouge L., Wiesmann C., Scheer J. M.** (2009). Crystal Structure of Procaspase-1 Zymogen Domain Reveals Insight into Inflammatory Caspase Autoactivation. *J Biol Chem*, 284(10), 6546–6553.

- **Fisher U., Jänicke R.U. and Schulze-Osthoff k.** (2002). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Nature, Cell Death and Differentiation* 10, 76–100
- **Fujise k., Zhang D., Juinn-lin Liui, and Yeh E. T. H.** (2000). Regulation of Apoptosis and Cell Cycle Progression by MCL1. *J Biol Chem*, 275, 39458–39465
- **Hanning G., and Makrides S.C.** (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. *Trends in Biotechnology* 16 (2), 54-60
- **Hoffman K., Bucher P. and Tschopp J.** (1997). The CARD domain: a new apoptotic signal motif. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 155-156
- **Janicke R. U., Sprengart M. L., Wati M. R., and Porter A. G.** (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J Biol Chem*, 273 (16), 9357–9360
- **Jansen R. and Gerstein M.** (2003). *Nucleic Acids Research*, 31 (8), 1-10
- **Kang H. J., Lee Y., Jeong Y., Park K., Jang M., Park S. G., Bae K., Kim M., Chung S. J.** (2008). Large-scale preparation of active caspase-3 in E. coli by designing its thrombin-activable precursors. *BMC Biotechnology*, 8 (92), 1472-6750
- **Kerr J. F. R., Wyllie A. H. and Curriet A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-256
- **Kruidering M. and I. Evan G. I.** (2000) Caspase-8 in Apoptosis: The Beginning of “The End”?. *IUBMB Life*, 50, 85–90,
- **Lippens S., Hoste E., Vandenabeele P., Agostinis P., Declercq W.** (2009). Cell death in the skin. *Apoptosis*, 14, 549–569
- **Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z., and Schulze-Osthoff K.** (2002). Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 978–988
- **Majno G. and Joris I.** (1995). Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, 146 (1), 3-15
- **Nicholson D. W.,** (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* 6, 1028-1042

- **Osinaga E.** (2007). Expression of Cancer-associated Simple Mucin-type O-glycosylated Antigens in Parasites. *IUBMB Life*, 59 (4–5), 269–273
- **Ow Y. P., Green D. R., Hao Z., Mak T. W.** (2008). Cytochrome c: functions beyond respiration. *Molecular Cell Biology* (9), 532-542
- **Pakala T., Molina M. and Wu G. Y.** (2016). Hepatic Echinococcal Cysts: A Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 4, 39–46
- **Paredes R., Jiménez V., Cabrera G., Iragüen D., Galanti N.** (2007). Apoptosis as a possible mechanism of infertility in Echinococcus granulosus hydatid cysts. *J Cell Biochem* 100, 1200-1209
- **Park H., Logette E., Raunser S., Cuenin S., Wals T., Tschopp J., Wu H.** (2007). Death Domain Assembly Mechanism Revealed by Crystal Structure of the Oligomeric PIDDosome Core Complex. *Cell*, 128
- **Parrish A. B., Freel C. D and Kornbluth S.** (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008672
- **Rojas M., Salmen S., Berrueta L.** (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA* 4 (3), 92-106
- **Rupinder S. K., Gurpreet A. K. and Manjeet S.** (2007). Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology*, 46, 383–393
- **Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sánchez R., ARboleda G.** (2008). Mitochondria y muerte celular. *NOVA, Ciencias Biomédicas*, 6 (10), 101-236
- **Sharp P. M., Li W. H.** (1987). The Codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codons usage bias, and its potential applications. *Nucleic acids research* 15, 1281-1295
- **Sivakumar P. K. and Prakash C. J.** (2016). Multi-level structure-based pharmacophore modelling of caspase-3-non-peptide complexes: Extracting essential pharmacophore features and its application to virtual screening. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 207-220

- **Smith S. A. and Richards K. S.** (1993). Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 79, 245-250
- **Sorensen H. P., and Mortensen K. K.** (2004). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113-128
- **Stennicke H. R., and Salvesen G. S.** (1997). Biochemical Characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8. *J biol chem*, 272 (41), 25719–25723
- **Studier F. W.** (2005). Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *NIH*, 41 (1), 207–234.
- **Vennervald B. J., and Polman K.** (2009). Helminths and malignancy. *Parasite Immunology*, 31, 686–696
- **Ventura Gallegos J. L., Gómez Gonzáles E. O., Zentella Dehesa A.** (1999). Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis. *BEB* 18 (4), 153-165
- **Yassin L. M., García L. F., Rojas M., Vásquez G.** (2006). Fallas en la remoción de cuerpos apoptóticos, una fuente de autoantígenos. *Rev. Colombiana de reumatología*, 13(1), 76-84
- **Zheng H., Zhang W., Zhang L., Zhang Z., Li J., Lu G., Zhu Y., Wang Y., Huang Y., Liu J., Kang H., Chen J., Wang L., Chen A., Yu S., Gao Z., Jin L., Gu W., Wang Z., Zhao L., Shi B., Wen H., Lin R., Jones M. K., Brejova B., Vinar T., Zhao G., McManus D. P., Chen Z., Zhou Y. and Wang S.** (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature, Genetics*, 45 (10), 1168- 1178

ANEXOS

7.1) ANEXO 1: PROTOCOLOS

- Precipitación de ADN plasmídico

1/10 del volumen original de ADN, de acetato de sodio 3M.

2 ½ volúmenes de EtOH 100% frío. Se deja precipitando ON

Centrifugación a alta velocidad durante 30 minutos. Se descarta el SN.

Se lava el pellet con EtOH 70% y se deja secar. Resuspender en H₂O milliQ.

- PCR

La siguiente tabla describe los componentes del mix que se prepara:

Concentración final	Volumen	Componentes
1X	5 uL	10X PCR solución amortiguadora (<i>minusMg</i>)
0.4 mM c/u	2 uL	10 mM mezcla de dNTP
0.4 mM	2 uL	50 mM MgCl ₂
0.4 uM c/u	2 uL c/u	mezcla de cebadores
-	2.5 uL	ADN molde
5U	1 uL	TaqDNApolimerasa
-	csp 50 uL	H ₂ O milliQ

Se programa el termociclador para 35 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, agregando una desnaturalización inicial a 94°C y una extensión final de 72°C de cinco minutos cada una.

- Ligación en pGemT Easy Vector

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en kb}}{\text{tamaño del vector en kb}} \times \text{inserto:vector relación molar} = \text{ng de inserto}$$

relación molar optimizada para este vector:

inserto:vector = 3:1

$\frac{50 \cdot 0,8}{3} \cdot \frac{3}{1} = 40$ ng de inserto

3 1

Por tanto se mezclan:

5 uL solución amortiguadora 2X T4 Ligasa (Promega)

1 uLpGemTEasy Vector (50ng/uL) (Promega)

4 uL ADN (10 ng/uL)

1 uL T4 Ligasa (3U/mL) (Promega)

- Ligación en pET22b(+)

4 uL ADN (~15ng/uL)

1 uL T4 Ligasa (3U/mL) (Promega)

5 uL solución amortiguadora 2X T4 Ligasa (Promega)

1 uL pET22b(+) (~20ng/uL) (Novagen)

- Transformación en células DH5α de *E. coli*

Descongelar una alícuota de 100 uL de células DH5α de *E. coli*

Mezclar suavemente la mezcla de ligación

incubar 30 minutos en hielo

Realizar un choque térmico de 30 segundos a 42°C

Incubar 2 minutos en hielo

Agregar 500 uL LB

Dejar 1 hora en agitador a 37°C.

Sembrar en placas LB + Ampicilina 100mg/mL

- Minipreparación alcalina de plásmidos

Centrifugar el precultivo a máxima velocidad 1 minuto. Descartar el sobrenadante.

Resuspender el pellet en 1 mL solución amortiguadora SET [sacarosa 20g; TrisHCl 1M pH7,6 5mL; EDTA 0,5M pH8 10mL; H₂O milliRo csp 100mL]. Vortexear durante 1 minuto.

Centrifugar a máxima velocidad 1 minuto. Descartar sobrenadante.

Resuspender el pellet en 150 uL de solución amortiguadora SET. Agregar 10 uL de solución amortiguadora RNasa [RNasa pancreática 10 mg/mL, acetato de sodio 0,1 M, EDTA 0,3M pH4.8, Incubado a 80°C para inactivar DNAsas]. Vortexear durante 1 minuto.

Agregar 350 uL de mezcla lítica de no más de dos semanas de antigüedad [SDS 10% 5mL, NaOH 10N 1mL, H₂O milliRo csp 50mL]. La solución debe volverse clara. Incubar 10 minutos en hielo.

Agregar 250 uL de solución amortiguadora acetato de sodio 3M pH4.8, invertir el tubo varias veces e incubar 30 minutos en hielo. Centrifugar a máxima velocidad 5 minutos a 4°C y pasar el sobrenadante a un eppendorf estéril. Agregar un volumen igual de isopropanol, invertir el tubo varias veces y centrifugar a máxima velocidad 5 minutos. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con EtOH 70%. Centrifugar a máxima velocidad 5 minutos, secar el pellet y resuspenderlo en H₂O milliQ.

- Gel poliacrilamida al 15%

Una vez armado el dispositivo para la cuba electroforética se prepara primero el gel de separación, se espera a que polimerice y luego se agrega el gel de concentración de acuerdo a la siguiente tabla:

Gel de concentración	Gel de separación
3.68 mL de H ₂ O	2.2 mL H ₂ O
460 uL de TrisHCl pH 6.8	2.7 mL TrisHCl pH 8.8
50 uL SDS10%	150 uL SDS 10%
850 uL acrilamida-bis (30:08)	4.9 mL acrilamida-bis (30:08)
5 uL TEMED	7.5 uL TEMED
25 uL Persulfato de amonio 10%	75 uL Persulfato de amonio 10%

Las muestras se preparan en solución amortiguadora de carga para proteínas 1X, se hierven a 100°C 10 minutos y luego son sembradas en el gel. Durante el gel stacking, la corrida se

realiza a 90 mV y durante el gel separador, a 140mV. Se tiñe con azul de Coomasie ON, y se destiñe con varios lavados de solución decolorante.

Azul de Coomasie: 30% etanol, 7% ácido acético y 0,25 g Coomasie Brilliant Bue R. Filtrar.

Solución decolorante: 30% etanol, 7% ácido acético.

- Transferencia/ Western blot

Realizar la transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa en una cuba con solución amortiguadora de transferencia [disolver en 100 mL con H₂O milliRo: 1,5 g Tris, 7,21 g Glicina, 0,5 g SDS; agregar 100 mL de EtOH y 300 mL H₂O milliRo] a 350 mA, 25V durante dos horas.

Para ello armar el cassette en el siguiente orden:

polo (+)
papel watman
membrana
gel
papel watman
polo (-)

Luego, desarmar el dispositivo y dejar la membrana en solución de bloqueo [50 mL TBST 1X, 2,5 g leche descremada, 1 g Glicina] a 4°C ON. El gel puede dejarse tiñendo en solución azul de coomasie.

Incubar la membrana con el anticuerpo primario en diluido 1/3000 en solución de bloqueo durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Realizar 3 lavados de 10 minutos de agitación con solución amortiguadora TBST [4 g NaCl, 0.1 g KCl, 1,5 g Tris en 400 mL H₂O milliRo, 250uL tween 20] a temperatura ambiente.

Incubar con el anticuerpo secundario diluido en TBST durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Realizar 2 lavados de 10 minutos con TBST en agitación a temperatura ambiente.

Realizar 1 lavado de 10 minutos con solución amortiguadora de revelado [para 50 mL: 5 mL TrisHCl 1M pH 9,5, 1 mL NaCl 5M y 2,5 mL MgCl₂ 1M] en agitación a temperatura ambiente.

Revelar en oscuridad el tiempo que sea necesario con solución amortiguadora de revelado + 33 uL NBT y 66 uL de BCIP.

- Mix para la digestión enzimática:

5 uL ADN

12 uL milliQ

2 uL solución amortiguadora NEB2

0.3 uL BSA

1 uL NdeI, 2 horas a 37°C.

1 uL Xho I, 2 horas a 37°C.

7.2) ANEXO 2: SOLUCIONES y MEDIOS DE CULTIVO

- Solución amortiguadora TAE (50X): 242 g Tris base, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA. Enrazar a 1000 mL con H₂O milliRo.
- Solución amortiguadora de carga para ADN (6X): 0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glicerol, enrazar en H₂O milliQ.
- Solución amortiguadora de carga para proteínas (4X): 0.25 M Tris HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glicerol, 20% βmercaptoetanol, 0,1 g azul de bromofenol.
- Solución amortiguadora NEB 2: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT. pH 7.9
- Solución amortiguadora fosfato de potasio: Para 250 mL pesar 5.7 g de KH₂PO₄ y 31.36 g de K₂HPO₄. Disolver en H₂O milliQ y autoclavar.
- Solución amortiguadora acetato de sodio 3M: Para 100 mL, disolver 40.8 g de acetato de sodio trihidratado en H₂O milliRo. Ajustar pH:5 y enrazar a 100 mL con H₂O milliRo.
- Solución amortiguadora de sonicación: fosfato de sodio 50mM; NaCl 300mM
- Medio de cultivo LB: Para 1 Lt 15.5 g Luria Broth, 4.5 g NaCl
- Medio de cultivo TB: Para 400 mL: 4.8 g de triptona, 9.6 g de extracto de levadura, 1.6 mL de glicerol, disolver en 330 mL de H₂O milliRo. Autoclavar. En condiciones de esterilidad, agregar 40 mL de solución amortiguadora fosfato de potasio KH₂PO₄:K₂HPO₄ (0.17:0.72) M; 200 uL de ampicilina 100 mg/mL, 400 uL de clorafenicol 34mg/mL.
- Medio de cultivo ZYM: Para 200 mL: Disolver 2 g de triptona, 1 g de extracto de levadura en 187 mL de H₂O milliRo. Agregar 400 uL MgSO₄ 1 M y 40 uL

oligoelementos 1000x. Esterilizar en autoclave. Una vez frío agregar en cámara de flujo: 8 mL de solución 5052 25X, 8 mL de solución M 25X, ampicilina 100 mg/mL 100 uL.

Solución 5052 25X: (para 100 mL) pesar y disolver 12.5 g de glicerol, 1.25 g de glucosa, 5 g de lactosa. Disolver en 80 mL de H₂O milliQ, enrazar a 100 mL y autoclavar.

Solución M 25X: (para 100 mL) pesar 8.88 g de Na₂HPO₄, 8.51 g de KH₂PO₄, 1.25 g NH₄Cl, y 1.77 g de Na₂SO₄. Disolver en 80 mL de agua, enrazar a 100 y autoclavar.

7.3) ANEXO 3: NOMENCLATURA DE CODONES

A modo de referencia, la siguiente tabla muestra la nomenclatura de los aminoácidos y los codones que los codifican, siendo de utilidad para la lectura de esta tesis.

GAC GAU	D	Ac. Aspártico
GAA GAG	E	Ac. Glutámico
CGA CGC CGG CGU AGA AGG	R	Arginina
AAA AAG	K	Lisina
AAC AAU	N	Asparagina
CAC CAU	H	Histidina
CAA CAG	Q	Glutamina
UCA UCC UCG UCU AGC AGU	S	Serina
ACA ACC ACG ACU	T	Treonina
GCA GCC GCG GCU	A	Alanina
GGA GGC GGG GGU	G	Glicina
GUA GUC GUG GUU	V	Valina
CCA CCC CCG CCU	P	Prolina
CUA CUC CUG CUU UUA UUG	L	Leucina
UUC UUU	F	Fenilalanina
UAC UAU	Y	Tirosina
AUA AUC AUU	I	Isoleucina
AUG	M	Metionina
UGG	W	Triptofano
UGC UGU	C	Cisteína
UAA UAG UGA		Terminación

Tabla 2. Nomenclatura de los codones y aminoácidos que codifican.